

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบ *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหารทะเลสด โดยอาศัยสมบัติการ
สร้างสารเฮลิคโสมชีรินแลกโทน

นางสาวกิติมา เชื้อพานิช

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF METHOD FOR *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* DETECTION IN
FRESH SEAFOOD BASED ON ACYL HOMOSERINE LACTONE
PRODUCTION PROPERTY

Miss Kitima Chueapanich

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบ *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหารทะเลสด โดยอาศัยสมบัติการสร้างสารเฮลิคโสมที่รีนแลกโทน

โดย

นางสาวกิติมา เชื้อพานิช

สาขาวิชา

เทคโนโลยีทางอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประภิตชัยวัฒนา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัชณิดา ธรรมมงคลกิจ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประภิตชัยวัฒนา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัชณิดา ธรรมมงคลกิจ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิรวรัตน์ ทัดติยกุล)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.สุนีย์ ไชตินีรนาท)

กิติมา เชื้อพานิช : การพัฒนาวิธีการตรวจสอบ *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหารทะเลสด โดยอาศัยสมบัติการสร้างสารเอซิลโฮโมซีรีนแลกโตน (DEVELOPMENT OF METHOD FOR *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* DETECTION IN FRESH SEAFOOD BASED ON ACYL HOMOSERINE LACTONE PRODUCTION PROPERTY)
 อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร.ชื่นจิต ประภิตชัยวัฒนา, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ.ดร.พัชณิตา ธรรมยงค์กิจ, 128 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบ *Vibrio parahaemolyticus* เชิงปริมาณในอาหารทะเลสด โดยอาศัยสมบัติการสร้างสัญญาณควอร์มเซนซิงชนิดเอซิลโฮโมซีรีนแลกโตน (AHL) การทดลองเริ่มจากการประเมินสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับสารมาตรฐาน AHL สำหรับพัฒนาเป็นวิธีทาง colorimetry ผลการทดลองพบว่า การใช้ Ferric chloride ($FeCl_3$) ทำปฏิกิริยากับ AHL ให้สารประกอบสีที่เด่นชัดและเสถียรที่สุด จึงเลือกใช้เป็นวิธีทาง colorimetry สำหรับใช้ในการตรวจสอบ AHL ที่สร้างจาก *V. parahaemolyticus* เมื่อตรวจยืนยันการสร้าง AHL โดยการวิเคราะห์สารชะจากโคโลนี (colony rinse) ของ *V. parahaemolyticus* ด้วย HPLC ผลการทดลองบ่งชี้ว่าแบคทีเรียชนิดนี้สร้างสาร AHL ชนิด 3-hydroxyl-C4-HSL เป็นหลัก เมื่อประเมินวิธีการตรวจสอบ AHL ที่สร้างจาก *V. parahaemolyticus* ด้วยวิธี colorimetry ที่พัฒนาได้ โดยการตรวจวัดสมบัติการดูดกลืนแสงของสารประกอบสีที่เกิดขึ้น พบว่ามีค่า λ_{max} ประมาณ 520 นาโนเมตร จากผลการทดลองยืนยันได้ว่าสารประกอบสีที่เกิดขึ้นในเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* เกิดจากการทำปฏิกิริยาเคมีที่จำเพาะระหว่าง $FeCl_3$ กับ AHL ที่เชื่อมสร้างขึ้นเท่านั้น ดังนั้นจึงใช้วิธี colorimetry ในการตรวจสอบ AHL ที่สร้างจาก *V. parahaemolyticus* ในการทดลองต่อไป เมื่อประเมินความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญกับการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีเกลือ พบว่าปริมาณ AHL ที่ตรวจวัดได้แปรผันตามจำนวนเซลล์ โดยในทุกความเข้มข้นเกลือ เมื่อเชื้อเจริญถึงจำนวนเซลล์ประมาณ $9 \log CFU/ml$ ค่า AHL ที่ตรวจวัดได้จะมีค่าเท่ากับ 0.1 (OD_{520}) เสมอ ดังนั้นจึงเลือกใช้ peptone water (ร้อยละ 1) ที่มีเกลือร้อยละ 8 เป็นระบบ selective pre-enrichment media สำหรับใช้ในการเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะอุดมหมู่มีห้อง และให้อากาศแบบ orbital shaking ที่ 200 rpm เพื่อให้เชื้อเริ่มต้นเพิ่มจำนวนมากขึ้นจนสร้าง AHL ถึงระดับที่ตรวจวัดได้ ($OD_{520} \geq 0.1$) โดยเวลาที่ใช้ในการเจริญจนสร้าง AHL ถึงระดับที่ตรวจวัดได้ดังกล่าว เรียกว่า detection time (DT) ซึ่งพบว่า ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงในระบบ selective pre-enrichment media นี้ เมื่อมีจำนวนเซลล์เริ่มต้น $10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7$ และ $10^8 CFU/ml$ จะมีค่า DT เท่ากับ 26, 24, 22, 20, 16, 14, 12 และ 10 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยที่จำนวนเซลล์เริ่มต้นและค่า DT มีความสัมพันธ์กันแบบเส้นตรง ($y = -0.386x + 11.82$) และมีค่า r^2 เท่ากับ 0.99 เมื่อตรวจสอบปัจจัยต่างๆที่อาจมีอิทธิพลต่ออัตราการเจริญและการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus* ได้แก่ การมีอันตรกิริยากับจุลินทรีย์ชนิดอื่น การสัมผัสกับอุณหภูมิแช่เย็นหรือแช่เยือกแข็งก่อนการเพาะเลี้ยง และอิทธิพลจากองค์ประกอบของอาหารทะเล พบว่า ทุกปัจจัยมีอิทธิพลต่อสมบัติการเจริญและการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus* อย่างมีนัยสำคัญ แต่ยังสามารถใช้สมการเส้นตรงเดิมในการทำนายจำนวนเซลล์เริ่มต้นได้ ยกเว้นการที่เชื้อสัมผัสกับอุณหภูมิแช่เยือกแข็ง มีผลให้เชื้อมีการเจริญช้าลง ทำให้ค่า DT ยาวขึ้น 2 ชั่วโมง เมื่อนำระบบที่พัฒนาได้ไปทดลองใช้ในการประมาณจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างอาหารทะเล ด้วยการติดตามค่า DT เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน MPN ก็พบว่าผลการตรวจสอบที่ได้มีความสอดคล้องกัน แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาได้มีศักยภาพที่จะใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลต่อไปได้

ภาควิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร.....

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร.....

ปีการศึกษา.....2552.....

ลายมือชื่อ.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5072217123 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORDS : *Vibrio parahaemolyticus* / AHL / Seafood / Detection time

KITIMA CHUEAPANICH : DEVELOPMENT OF METHOD FOR *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* DETECTION IN FRESH SEAFOOD BASED ON ACYL HOMOSERINE LACTONE PRODUCTION PROPERTY. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. CHUENJIT PRAKITCHAIWATTANA, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASST. PROF. PATCHANITA THAMAYONGKIT, Ph. D., 128 pp.

This study aimed to develop the methods for quantitative determination of *V. parahaemolyticus* based on its quorum sensing; acyl homoserine lactone (AHL) production property. Initially, the chemical reactions for AHL standard detection was evaluated to be developed as the colorimetric method. It was found that the coloring complex from AHL and FeCl_3 reaction was more obvious and stable, compared with the reaction using $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ reagent. This reaction was then used as the detection method for AHL produced from *V. parahaemolyticus*. The AHL production of *V. parahaemolyticus* was confirmed by HPLC analysis. The results indicated that *V. parahaemolyticus* could produce mainly 3-hydroxyl-C4-HSL. Subsequently, the colorimetric method for the detection of AHL from *V. parahaemolyticus* was evaluated by determining the absorption property of the coloring complex. It was found that the coloring complex had maximum absorption (λ_{max}) at 520 nm. In addition, the results also indicated that the coloring complex in the culture of *V. parahaemolyticus* was generated from the specific reaction between FeCl_3 and AHL. The medium composition and metabolites secreted from *V. parahaemolyticus* did not interfere the colorimetric detection. The colorimetry was then used to investigate AHL production property of *V. parahaemolyticus* cultured under salt conditions. It was found that the AHL production of *V. parahaemolyticus* cultivated under these conditions depended upon cell density and it was detectable at 0.1 (OD_{520}) when cell density reached approximately $9 \log \text{CFU/ml}$. Therefore, 1%peptone water containing 8%NaCl was used as selective pre-enrichment media for *V. parahaemolyticus* to produce AHL by cultivation at 200 rpm orbital shaking at room temperature. The cell number of *V. parahaemolyticus* could be estimated from the detection time (DT) when initial cell reached $9.1 \log \text{CFU/ml}$. In pure culture system, the DT was 26, 24, 22, 20, 16, 14, 12 and 10 hours for the initial cell population at 10 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 and 10^8 CFU/ml, respectively ($y = -0.386x + 11.82$). The factors that might influence the growth and AHL production of *V. parahaemolyticus* including bacterial interaction, exposure of cells to chilling and freezing temperature prior to determination and food matrix were investigated. It was found that all factors significantly influenced the growth and AHL production but the same DT equation could still be used to estimate cell population. In exception, the pre-exposure of cell to freezing temperature resulted in slow growth in the selective pre-enrichment condition, leading to a delay in DT for two hours. Finally, the developed method was then used for quantitative determination of *V. parahaemolyticus* in seafood sample comparing with MPN method. The results from both methods were correlated. It indicated that this methodology can be potentially used for *V. parahaemolyticus* detection in fresh seafood.

Department : Food Technology

Student's Signature

Field of Study : Food Technology

Advisor's Signature

Academic Year : 2009

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ โดยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประภิตชัยวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัชณิตา ธรรมมงคลกิจ ที่ได้กรุณาสละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนความเอาใจใส่ดูแลและให้ความช่วยเหลืออย่างใกล้ชิดมาโดยตลอด รวมถึงกรุณาช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิรวรัตน์ ทัดตียกุล และดร.สุนีย์ โชตินิรันดา กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ เป็นอย่างสูงที่กรุณาเสียสละเวลามาตรวจสอบ พร้อมทั้งชี้แนะแนวทางในการปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภายใต้การเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัย ทุน สกว.- อุตสาหกรรม และบริษัท ไทย- นีโอ ไบโอเทค จำกัด ที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิจัย

ขอขอบคุณบริษัท ไทยเดลมาร์ จำกัด ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างอาหารทะเลสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการทำวิจัย

ขอบคุณพี่ น้องและเพื่อนๆ ปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ที่ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจตลอดการวิจัย รวมถึงเจ้าหน้าที่ในภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกท่าน สำหรับการอำนวยความสะดวกในการวิจัย

ท้ายสุดนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวเชื้อพานิชทุกท่าน ที่ได้สั่งสอนให้ผู้วิจัยมีความอดทน ใจกล้าใจ และความหวังดีพร้อมทั้งสนับสนุนในด้านทุนทรัพย์ให้แก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 วารสารปริทัศน์.....	3
2.1 <i>V. parahaemolyticus</i>	3
2.2 วิธีการตรวจสอบ <i>V. parahaemolyticus</i>	6
2.2.1 Most probable number (MPN)	6
2.2.2 DNA hybridization.....	7
2.2.3 Polymerase chain reaction (PCR)	8
2.2.4 Chromogenic medium.....	8
2.3 ควอรัมเซนซิง.....	9
2.4 กลไกการทำงานของสัญญาณควอรัมเซนซิง	9
2.4.1 การผลิตสัญญาณควอรัมเซนซิง	10
2.4.2 การสะสมสัญญาณควอรัมเซนซิง.....	10
2.4.3 การรับสัญญาณควอรัมเซนซิง.....	10
2.5 กลุ่มของสัญญาณควอรัมเซนซิง.....	11
2.5.1 Acyl homoserine lactone.....	11
2.5.2 Furanosyl borate, nonborated diester.....	11
2.5.3 Oligo- และ cyclic dipeptide.....	11
2.6 ควอรัมเซนซิงชนิด AI-1.....	13
2.7 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสร้าง AHL ในแบคทีเรียแกรมลบ.....	17
2.8 ควอรัมเซนซิงในจีโนส <i>Vibrios</i>	18
2.8.1 ควอรัมเซนซิงใน <i>V. harveyi</i>	18

บทที่	ช หน้า
2.8.2 ควอรัมเซนซิงใน <i>V. cholerae</i>	20
2.8.3 ควอรัมเซนซิงใน <i>V. vulnificus</i>	20
2.8.4 ควอรัมเซนซิงใน <i>V. parahaemolyticus</i>	21
2.9 วิธีการตรวจสอบ AHL.....	21
2.9.1 การตรวจสอบทางชีวภาพ (Bioassay)	21
2.9.2 Thin layer chromatography (TLC)	22
2.9.3 Liquid chromatography- mass spectrometry (LC-MS)	23
2.9.4 Colorimetry.....	23
3 การดำเนินงานวิจัย.....	26
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	38
5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	81
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	81
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	82
รายการอ้างอิง.....	84
ภาคผนวก.....	97
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์ทางเคมี.....	98
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์.....	100
ภาคผนวก ค ข้อมูลผลการทดลองเพิ่มเติม.....	102
ภาคผนวก ง ผลการประมาณจำนวนเซลล์ <i>V. parahaemolyticus</i> ด้วย วิธีมาตรฐาน MPN.....	103
ภาคผนวก จ การวิเคราะห์ผลทางสถิติ.....	123
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	128

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	คุณลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียก่อโรคในกลุ่ม <i>Vibrionaceae</i> ที่พบการปนเปื้อนในอาหารทะเล	5
2.2	โมเลกุลสัญญาณควอรัมเซนซิง.....	12
2.3	ตัวอย่างการควบคุมการแสดงออกทางพีโนไทป์ของ AHL ในแบคทีเรียแกรมลบ.....	15
2.4	monitor strains และการตอบสนองต่อโมเลกุลสัญญาณ AHL.....	22
3.1	mobile phase ที่ใช้ในการวิเคราะห์สาร AHL ด้วย HPLC	31
3.2	สายพันธุ์ของแบคทีเรีย และอัตราส่วนของจำนวนเซลล์ชนิดต่างๆที่ใช้ในการทดลอง	34
3.3	ชนิดและแหล่งที่มาของอาหารทะเลที่ใช้ในการทดลอง.....	37
4.1	ค่า OD ₅₂₀ ที่ระยะเวลาต่างๆ จากการวิเคราะห์ด้วยการทดลอง 4.1.1.....	39
4.2	ค่า OD ₅₂₀ ที่ระยะเวลาต่างๆ จากการวิเคราะห์ด้วยการทดลอง 4.12.....	40
4.3	การเจริญและการสร้าง AHL ภายใต้สภาวะที่มีเกลือที่เวลาต่างๆ.....	50
4.4	อัตราการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์และอัตราการเพิ่มขึ้นของปริมาณ AHL ที่ <i>V. parahaemolyticus</i> สร้างขึ้น แสดงในค่าของความชัน.....	55
4.5a	จำนวนเซลล์ (logCFU/ml) ของ <i>V. parahaemolyticus</i> DMST 22093 ที่เพาะเลี้ยงใน peptone water (ร้อยละ 1) ที่มีเกลือร้อยละ 8 ภายใต้สภาวะ อุณหภูมิห้องและให้อากาศแบบ orbital shaking ที่ 200 rpm ที่เวลาต่างๆ.....	61
4.5b	ค่า OD ₅₂₀ ที่ตรวจวัดจากคัลเจอร์ของ <i>V. parahaemolyticus</i> DMST 22093 ที่เพาะเลี้ยงใน peptone water (ร้อยละ 1) ที่มีเกลือร้อยละ 8 ภายใต้สภาวะ อุณหภูมิห้องและให้อากาศแบบ orbital shaking ที่ 200 rpm ที่เวลาต่างๆ.....	62
4.6	ตารางต้นแบบสำหรับการประเมินจำนวนเซลล์เริ่มต้นของ <i>V. parahaemolyticus</i>	63
4.7	อันตรกิริยากับจุลินทรีย์ชนิดอื่นต่อการเจริญและการสร้าง AHL ของ <i>V. parahaemolyticus</i>	66
4.8	ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการสร้าง AHL ของ <i>V. parahaemolyticus</i>	67
4.9	ค่า OD ₅₂₀ เมื่อมีอิทธิพลจากองค์ประกอบของอาหารทะเล.....	69
4.10	อิทธิพลจากองค์ประกอบของอาหารทะเลต่อการเจริญและการสร้าง AHL ของ <i>V. parahaemolyticus</i>	70
4.11	การประมาณจำนวนเซลล์ <i>V. parahaemolyticus</i> ในระบบเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี colorimetry และวิธีมาตรฐาน MPN.....	72

ตารางที่		
4.12	การประมาณจำนวนเซลล์ <i>V. parahaemolyticus</i> ในอาหารทะเลสด ด้วยวิธีการติดตาม DT และวิธีมาตรฐาน MPN	75
4.13	ผลการตรวจสอบจำนวนเซลล์และ % การสร้าง AHL ของแบคทีเรียที่ตรวจพบในตัวอย่างอาหารทะเลทั้ง 14 ชนิด.....	79
ข.1	MPN Index.....	101
ค.1	%measured absorbance ที่คำนวณได้ที่เวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง (รัชนีดา เดชอุดม, 2550).....	102
ค.2	จำนวนเซลล์และปริมาณ AHL บ่งชี้ด้วยค่า OD ₅₂₀ เมื่อเพาะเลี้ยง <i>V. parahaemolyticus</i> ในสภาวะที่ไม่ให้อากาศ.	102
จ.1	การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของจำนวนเซลล์ <i>V. parahaemolyticus</i> เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นต่างๆ.....	123
จ.2	การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณที่ AHL ซึ่งบ่งชี้ในค่า OD ₅₂₀ ที่ตรวจวัดได้จาก <i>V. parahaemolyticus</i> เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นต่างๆ.....	123
จ.3	การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของจำนวนเซลล์ <i>V. parahaemolyticus</i> เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ.....	124
จ.4	การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณที่ AHL ซึ่งบ่งชี้ในค่า OD ₅₂₀ ที่ตรวจวัดได้จาก <i>V. parahaemolyticus</i> เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ... ..	124
จ.5	การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของจำนวนเซลล์ <i>V. parahaemolyticus</i> เมื่อมีอิทธิพลของอุณหภูมิ.....	125
จ.6	การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณ AHL ซึ่งบ่งชี้ในค่า OD ₅₂₀ ที่ตรวจวัดได้จาก <i>V. parahaemolyticus</i> เมื่อมีอิทธิพลของอุณหภูมิ.....	125
จ.7	การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของค่า OD ₅₂₀ เมื่อมีอิทธิพลจากองค์ประกอบของอาหารทะเล.....	126
จ.8	การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของจำนวนเซลล์ <i>V. parahaemolyticus</i> เมื่อมีอิทธิพลจากองค์ประกอบของอาหารทะเล.....	126
จ.9	การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณ AHL ซึ่งบ่งชี้ในค่า OD ₅₂₀ ที่ตรวจวัดได้จาก <i>V. parahaemolyticus</i> เมื่อมีอิทธิพลจากองค์ประกอบของอาหารทะเล.....	127

สารบัญญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1	7
2.2	10
2.3	13
2.4	14
2.5	19
2.6	24
2.7	24
2.8	25
4.1	41
4.2	41
4.3	43
4.4	44
4.5	44
4.6	45
4.7	46
4.8	52
4.9	53
4.10	57

รูปที่	ฉ หน้า
4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ (logCFU/ml) กับปริมาณ AHL ตรวจวัดในค่า OD ₅₂₀ ในช่วงที่ตรวจวัดได้ที่เพาะเลี้ยงใน peptone water (ร้อยละ 1) ที่มีเกลือ ร้อยละ 8 ภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้อง และให้อากาศแบบ orbital shaking ที่ 200 rpm.....	57
4.12 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์เริ่มต้นของ <i>V. parahaemolyticus</i> (logCFU/ml) กับ detection time.....	63
4.13 สรุปลักษณะที่ใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อน <i>V. parahaemolyticus</i> ในอาหารทะเล	73

บทที่ 1

บทนำ

Vibrio parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง จัดอยู่ในกลุ่ม obligate halophile ลักษณะเด่นของเชื้อชนิดนี้คือ สามารถมีชีวิตอยู่ในอาหารหรือน้ำที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ตั้งแต่ร้อยละ 0.5 ถึง 8 และเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ ดังนั้นจึงพบการปนเปื้อนได้ทั้งในอาหารทะเลสดและผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแช่แข็ง โดยเฉพาะ ปลา ปู กุ้ง และหอยนางรม เป็นต้น *V. parahaemolyticus* จัดเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารที่สำคัญ โดยก่อโรคอาหารเป็นพิษหรือทางเดินอาหารอักเสบ ในประเทศไทยพบว่าเชื้อชนิดนี้ก่อให้เกิดโรคกับคนไทยสูงที่สุดเป็นอันดับหนึ่งติดต่อกันมาเป็นระยะเวลายาวนานกว่า 10 ปี (กองควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข, 2549)

ในปัจจุบันการตรวจสอบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเล ยังคงประกอบด้วยหลายขั้นตอน ได้แก่ การเลี้ยงในอาหารเหลวแบบ pre-enrichment และ selective enrichment แล้วจึงเลี้ยงบนอาหารแข็งแบบ selective plating เพื่อแยกโคโลนี และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของโคโลนี ส่วนการตรวจสอบระดับการปนเปื้อนจะใช้วิธีทดสอบแบบ Most Probable Numbers (MPN) ซึ่งทั้งสองวิธีใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบนานถึง 5 วัน สิ้นเปลืองแรงงานและค่าใช้จ่าย และในปัจจุบันก็ยังไม่มียังไม่มีวิธีตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ที่รวดเร็ว สำหรับใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนในกระบวนการผลิตอาหาร ดังนั้นหากสามารถพัฒนาวิธีที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพสำหรับใช้ในการตรวจแบคทีเรียดังกล่าว จะทำให้ได้วิธีทางเลือกที่ใช้ในการตรวจสอบจุลินทรีย์ชนิดนี้ร่วมกับระบบการควบคุมคุณภาพเพื่อให้การผลิตอาหารทะเลสดมีประสิทธิภาพและมีความปลอดภัยมากยิ่งขึ้น

ตั้งแต่ปี 1970 มีรายงานว่าเซลล์จุลินทรีย์สามารถสื่อสารกันด้วยการส่งสัญญาณทางเคมีที่เรียกว่าควอรัมเซนซิง ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก อาจเรียกว่า autoinducer หรือ bacterial pheromone ตามลักษณะโครงสร้างทางเคมี สัญญาณควอรัมเซนซิงแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ AI-1, AI-2 และ AI-3 จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะสร้างสัญญาณควอรัมเซนซิงที่มีรูปแบบและปริมาณแตกต่างกันออกไป เมื่อจุลินทรีย์สร้างสัญญาณควอรัมเซนซิงมากถึงระดับหนึ่งจะทำให้เกิดการเหนี่ยวนำกระบวนการทางพันธุกรรมและก่อให้เกิดการแสดงออกของฟีโนไทป์ในรูปแบบต่างๆ เช่น การเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ การสร้างสปอร์ การเกิดไบโอฟิล์ม และการผลิตเอนไซม์หลั่งออกมานอกเซลล์ เป็นต้น (Gobbetti และคณะ, 2007) กลุ่มของสัญญาณควอรัมเซนซิงที่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางโดยเฉพาะในแบคทีเรียแกรมลบ คือ สัญญาณในกลุ่มเอซิลโฮโมซีรีนแลกโตน (AHL) ซึ่ง *V. parahaemolyticus* เป็นจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งที่สร้างสารในกลุ่ม AHL เป็นหลัก โดยสร้าง AHL ชนิด 3-hydroxyl-C4-HSL (Henke และ Bassler, 2004) การตรวจสอบสาร

AHL ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นมีด้วยกันหลายวิธี ได้แก่ bioassay, thin-layer chromatography (TLC) และ high-performance liquid chromatography (HPLC) ซึ่งแต่ละวิธีเป็นวิธีเชิงคุณภาพและค่อนข้างมีความซับซ้อน เมื่อประมาณปี 2006 มีรายงานว่าสารในกลุ่มเอซิลไฮโมซีรีนแลกโทนนี้สามารถตรวจวัดได้โดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมีที่เรียกว่า ปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน Ferric(III)-hydroxamate เกิดเป็นสารสีที่สามารถตรวจวัดได้ ซึ่งหลักการดังกล่าวน่าจะสามารถนำมาใช้เป็นพื้นฐานที่จะพัฒนาเป็นวิธีการตรวจสอบ AHL ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นโดยอาศัยปฏิกิริยาเคมีที่ตรวจวัดผลได้อย่างรวดเร็ว

จากแนวคิดนี้งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบการปนเปื้อน *Vibrio parahaemolyticus* เชิงปริมาณในอาหารทะเลสด โดยอาศัยสมบัติการสร้างสัญญาณควอรัมเซนซิง ชนิดเอซิลไฮโมซีรีนแลกโทน (AHL) ซึ่งน่าจะเป็นวิธีทางเลือกหนึ่งสำหรับประยุกต์ใช้ในระดับห้องปฏิบัติการหรือในระดับโรงงานอุตสาหกรรมได้

บทที่ 2 วารสารปริทัศน์

2.1 *V. parahaemolyticus*

แบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrionaceae* พบได้ทั่วไปในน้ำทะเลและสัตว์ทะเล โดยเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในสัตว์ทะเลหลายชนิด เช่น ปลาและปลาหมึก ดังนั้นจึงมักพบการปนเปื้อนในอาหารทะเลอยู่บ่อยครั้ง ตามรายงานของ Bacteriological analytical manual online (BAM), USFDA; May 2004 แบ่งจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Vibrionaceae* ที่พบการปนเปื้อนในอาหารทะเลได้ทั้งหมด 11 สายพันธุ์ แสดงชนิดและคุณลักษณะทางชีวเคมีดังตารางที่ 2.1 สายพันธุ์ที่พบการก่อโรคในอาหารอยู่บ่อยครั้ง ได้แก่ *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารที่สำคัญ ซึ่งก่อให้เกิดอาการทางคลินิกมากมาย ได้แก่ อาการโลหิตเป็นพิษ อหิวาตกโรค ภาวะอาหารและลำไส้อักเสบ และการติดเชื้อทางบาดแผล (Lake และคณะ, 2003) โดยคนจะได้รับเชื้อจากการสัมผัสหรือบริโภคอาหารทะเลที่มีการปนเปื้อน หรือการที่บาดแผลสัมผัสกับน้ำทะเล มีรายงานว่าจุลินทรีย์ก่อโรคที่สำคัญในกลุ่ม non-cholera ที่มีการแพร่กระจายในน้ำทะเลมากที่สุดคือ *V. parahaemolyticus* (Su และ Lui, 2007)

V. parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง ไม่สร้างสปอร์ สร้างเอนไซม์ oxidase เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) จัดอยู่ในกลุ่ม moderately obligate halophile พบแหล่งอาศัยอยู่ในน้ำทะเลและน้ำกร่อย ลักษณะเด่นของเชื้อชนิดนี้คือ สามารถมีชีวิตอยู่ในอาหารหรือน้ำที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ตั้งแต่ร้อยละ 0.5 ถึง 8 ความเข้มข้นเกลือที่เหมาะสมคือ ร้อยละ 3 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ โดยเจริญได้ในช่วง 5-43 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 37 องศาเซลเซียส ช่วง water activity (a_w) ที่เจริญได้คือ 0.940-0.996 เจริญได้ดีที่สุดที่ $a_w = 0.980$ สามารถเจริญได้ในช่วง pH 4.8-11 ช่วง pH ที่เหมาะสมคือ 8.6-8.8 การเจริญจะถูกยับยั้งได้ด้วย 0.1% acetic acid (pH 5.1) (Lake และคณะ, 2003)

V. parahaemolyticus เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารที่สำคัญ โดยก่อให้เกิดโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) และการติดเชื้อทางบาดแผล (wound infection) สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยส่วนใหญ่จะสร้างสารพิษ thermostable direct hemolysin (TDH) สามารถจำแนก serotype ของเชื้อชนิดนี้ได้จากชนิดของแอนติเจน โดยจำแนกเป็น O-antigen (cell wall antigen, 13 ชนิด) และ K-antigen (capsule antigen, 71 ชนิด) โดยพบว่า serotype

ที่เป็นสายพันธุ์ก่อโรค คือ O3:K6, O1:K25, O1:KUT, O4:K8 และ O4:K68 (Bhuiyan และคณะ, 2002)

พบการระบาดครั้งแรกในประเทศญี่ปุ่นในปี 1950 (Fujino และคณะ, 1953) สาเหตุเกิดจากการบริโภคปลาดิบ จากนั้นจึงพบการระบาดไปทั่วโลก โดยเฉพาะ Serotype O3:K6 พบการปนเปื้อนในอาหาร และก่อโรคระบาดในคนอยู่ในหลายประเทศ ได้แก่ ไต้หวัน ลาว ญี่ปุ่น ไทย เกาหลี และสหรัฐอเมริกา (Matsumoto และคณะ, 2000) ในฤดูร้อนและต้นฤดูใบไม้ร่วงจะพบการระบาดที่รุนแรง เนื่องมาจากอุณหภูมิของน้ำทะเลที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียชนิดนี้ สำหรับในประเทศไทยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในฐานะห้องปฏิบัติการอ้างอิง ได้ดำเนินการเฝ้าระวังโรคติดต่อทางอาหารและน้ำ ที่เกิดจากเชื้อกลุ่ม *Vibrio* พบผู้ป่วยกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) จากการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* สูงเป็นอันดับหนึ่ง ประมาณปีละ 1,000-2,000 ราย สาเหตุจากการรับประทานอาหารทะเลสุกๆดิบๆ โดยพบการปนเปื้อนได้ทั้งในอาหารทะเลสดและผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแช่แข็ง โดยเฉพาะ ปลา ปู กุ้ง และหอยนางรม เป็นต้น

ทั้งนี้อาหารทะเลจัดเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญเป็นอันดับต้นๆของประเทศไทยและปัจจุบันผู้บริโภคนิยมรับประทานอาหารทะเลดิบในรูปแบบต่างๆมากขึ้น เช่น ซูชิ ซึ่งพบว่ามีวางขายอยู่ทั่วไป ส่งผลให้ผู้บริโภคมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อชนิดนี้สูงขึ้น ดังนั้นการควบคุมและประกันคุณภาพอาหารทะเลจึงควรมีประสิทธิภาพและได้มาตรฐาน การพัฒนาวิธีตรวจสอบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลที่มีความรวดเร็ว แม่นยำ ราคาถูก และสามารถใช้งานได้จริงในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร จึงถือเป็นมาตรการสำคัญที่จะสามารถควบคุมและป้องกันการแพร่เชื้อชนิดนี้มาสู่คนได้

ตารางที่ 2.1 คุณลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่เรียกก่อโรคในกลุ่ม *Vibrionaceae* ที่พบการปนเปื้อนในอาหารทะเล (Bacteriological analytical manual

(BAM); USFDA, 2004 : online)

Biochemical characteristics of human pathogenic <i>Vibrionaceae</i> commonly encountered in seafood*											
	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. furnissii</i>	<i>V. hollisae</i>	<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>A. hydrophila</i> **	<i>P. shigelloides</i> **
TCBS agar	Y	Y	Y	Y	NG	Y	G	G	G	Y	G
mCPC agar	NG	P	NG	NG	NG	NG	NG	NG	Y	NG	NG
CC agar	NG	P	NG	NG	NG	NG	NG	NG	Y	NG	NG
AGS	KA	Ka	KK	KK	Ka	KK	KA	KA	KA	KK	nd
Oxidase	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Arginine dihydrolase	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+
Lysine decarboxylase	+	+	-	-	-	+	+	+	+	V	+
Growth in (w/v):	0% NaCl	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+
	3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6% NaCl	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
	8% NaCl	+	-	V	+	-	V	-	+	-	-
	10% NaCl	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 42°C	+	+	V	-	nd	V	+	+	+	V	+
Acid from:	Sucrose	+	+	+	+	-	+	-	-	V	-
	D-Cellobiose	-	-	+	-	-	-	V	+	+	-
	Lactose	-	-	-	-	-	-	-	+	V	-
	Arabinose	-	-	+	+	+	-	-	+	V	-
	D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	V	-
	D-Mannitol	+	+	+	+	-	+	+	+	V	-
	ONPG	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-
Voges-Proskauer	+	V	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Sensitivity to:	10 µg O/129	R	S	R	R	nd	S	S	R	S	S
	150 µg O/129	S	S	S	S	nd	S	S	S	R	S
	Gelatinase	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
	Urease	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-

* Adapted from Elliot *et al.* (31)
 ** *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*

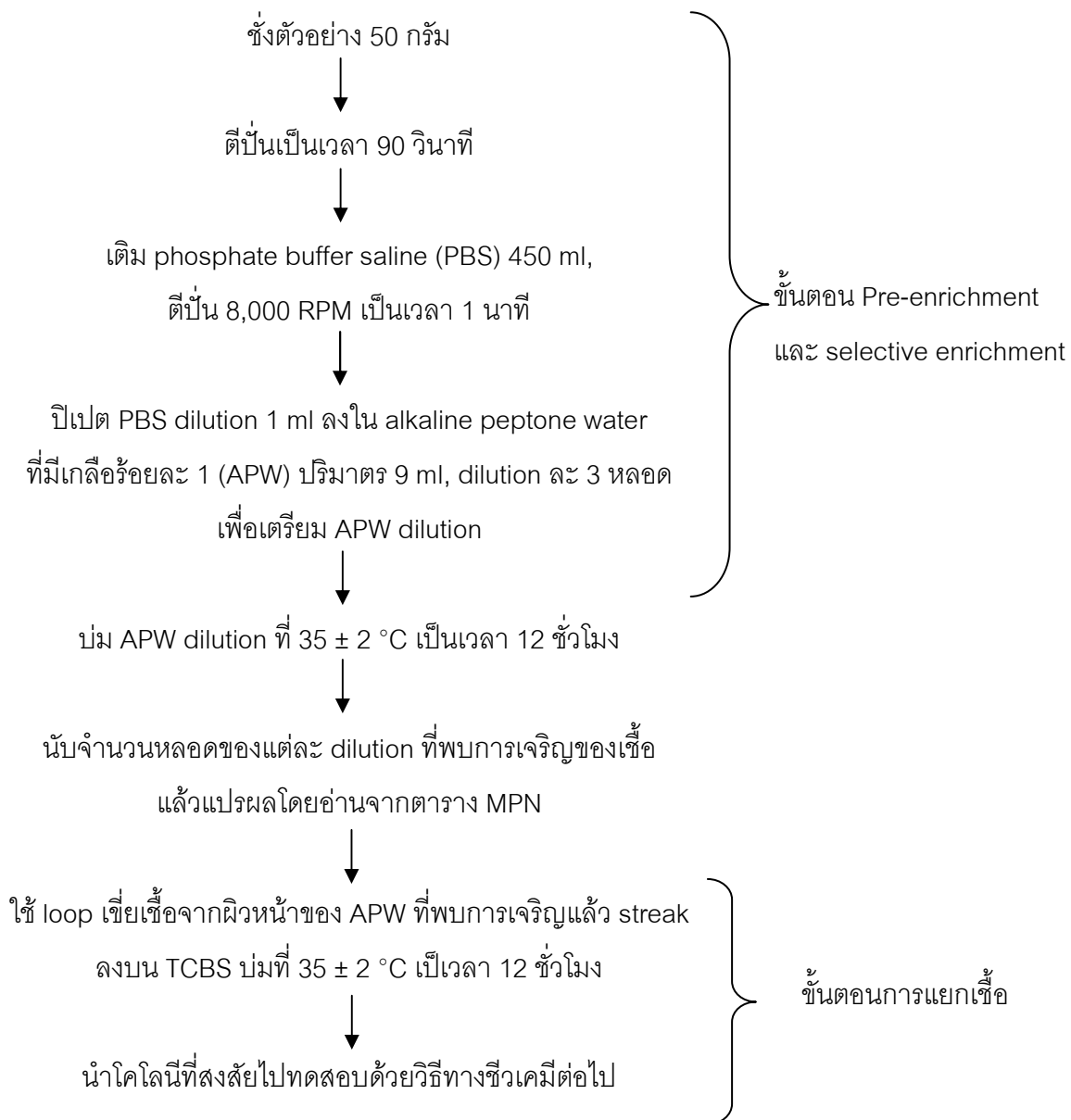
Abbreviations: TCBS, thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose; mCPC, modified cellobiose-polymyxin B-colistin; AGS, arginine-glucose slant;
 Y = yellow NG = no or poor growth S = susceptible nd = not done
 G = green V = variable among strains R = resistant P = purple, V = variable
 KK = Slant alkaline / Butt alkaline KA = Slant alkaline / Butt acidic, Ka = Slant alkaline/ Butt slightly acidic

2.2 วิธีการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus*

ในปัจจุบันวิธีการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลสดที่ถือปฏิบัติกันในห้องปฏิบัติการของโรงงานอุตสาหกรรมอาหารนั้นยังคงเป็นวิธีดั้งเดิมที่ประกอบไปด้วยขั้นตอนต่างๆหลายขั้นตอน ได้แก่ pre-enrichment, selective enrichment, selective plating, isolation of colony, biochemical test และ serological test (Bacteriological analytical manual (BAM); USFDA, 2004 : online) อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยที่พยายามพัฒนาวิธีตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* เกิดขึ้นใหม่ด้วยกันหลายวิธี เช่น การใช้เทคนิค PCR และ DNA hybridization ดังจะได้กล่าวต่อไป

2.2.1 Most probable number (MPN)

องค์การอาหารและยาสหรัฐอเมริกา (FDA's Bacteriological Analytical Manual chapter 9, May 2004) กำหนดให้วิธี MPN เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับใช้ตรวจสอบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ในอาหาร ขั้นตอนการตรวจสอบแสดงดังรูปที่ 2.1 ซึ่งประกอบไปด้วย ขั้นตอนการเลี้ยงในอาหารเหลวแบบ pre-enrichment และ selective enrichment เพื่อให้เซลล์ที่อ่อนแอเกิดการฟื้นตัว และเพิ่มจำนวน เป็นการเพิ่มโอกาสในการตรวจพบ จากนั้นเลี้ยงบนอาหารแข็ง thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar (TCBS) แบบ selective plating เพื่อแยกโคโลนี โดยโคโลนีของ *V. parahaemolyticus* จะมีสีเขียวลักษณะกลม ขนาด 2-3 มิลลิเมตร จากนั้นนำโคโลนีที่สงสัยไปตรวจยืนยันด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของโคโลนี เช่น ความสามารถในการเจริญในเกลือความเข้มข้นต่างๆ กิจกรรมการสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ เป็นต้น การตรวจสอบด้วยวิธีนี้ต้องใช้เวลาานกว่า 5 วัน จึงจะทราบผลการตรวจสอบที่ถูกต้อง



รูปที่ 2.1 วิธีการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างอาหารด้วยวิธีมาตรฐาน MPN

ที่มา : ดัดแปลงจาก Bacteriological Analytical Manual (BAM); USFDA, 2004

2.2.2 DNA hybridization

DNA–DNA hybridization เป็นวิธีทางชีวโมเลกุล โดยการพัฒนา probe แบบ non-radioactive 2 ชนิด (alkaline phosphatase (AP)-labeled และ digoxigenin (DIG)-labeled probes) สำหรับตรวจสอบยีนจำเพาะ *tlh* ที่ปรากฏใน *V. parahaemolyticus* (McCarthy และคณะ, 1999) วิธีนี้มีความไวและจำเพาะสูง และด้วยหลักการของวิธี AP- และ DIG-labeled probe จึงมีการพัฒนาวิธี direct-plating โดยใช้ AP- และ DIG-labeled probe ในการตรวจสอบ

ยื่น *tlh* สำหรับการตรวจหา total *V. parahaemolyticus* (Gooch และคณะ, 2001) วิธีตรวจสอบเหล่านี้สามารถตรวจได้ภายใน 1-2 วัน อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ต้องการผู้ที่มีความเชี่ยวชาญในการตรวจสอบ เนื่องจากมีขั้นตอนการปฏิบัติที่ค่อนข้างซับซ้อน ประกอบด้วย colony lift, hybridization และ colorimetric detection รวมไปถึงขั้นตอนการเตรียม probe และ membrane นอกจากนี้ Banerjee และคณะ (2002) ได้พัฒนาวิธี rapid DNA probe method สำหรับการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ที่สามารถเจริญบน hydrophobic grid membrane filters (HGMF) ได้ ถึงแม้ว่าวิธีนี้จะสามารถตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ได้ภายใน 1 วัน หลังจากผ่านขั้นตอน enrichment แต่วิธีนี้ก็ยังคงเป็นวิธีที่ซับซ้อน

2.2.3 Polymerase chain reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction หรือ (PCR) เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการ DNA Replication ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สาย DNA สายใหม่จาก DNA ต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้นและได้ DNA สายใหม่เกิดขึ้นมากมาย ในปี 1992 Tada และคณะ ได้พัฒนาเทคนิค PCR สำหรับใช้ตรวจสอบยีนจำเพาะ (*tdh* และ *trh*) ที่พบใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ก่อความรุนแรง (virulent strain) และในปี 1999 Bej และคณะ พัฒนาเทคนิค multiplex PCR สำหรับใช้ตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ได้ทุกสายพันธุ์โดยทดลองตรวจสอบในตัวอย่างหอย วิธีนี้สามารถตรวจสอบเซลล์ได้ที่เซลล์จำนวนน้อยเพียง 1-10 เซลล์ ต่อกรัมตัวอย่างที่ enrich ใน alkaline peptone water เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

Kaufman และคณะ (2004) พัฒนาการตรวจสอบจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ทั้งหมดในเนื้อหอยนางรม โดยใช้เทคนิค real-time PCR ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่รวดเร็ว สามารถบ่งชี้จำนวน *V. parahaemolyticus* ได้ภายในระยะเวลา 1 ชั่วโมง

2.2.4 Chromogenic medium

มีการพัฒนา chromogenic medium (Bio-Chrome Vibrio medium) สำหรับใช้จำแนกความแตกต่างของ *V. parahaemolyticus* ออกจากสายพันธุ์อื่นในจลินัส *Vibrio* โดยอาศัยความสามารถในการสร้างเอนไซม์ β -galactosidase ซึ่งจะไปย่อย substrate ในอาหาร ทำให้โคโลนีของ *V. parahaemolyticus* บนอาหาร Bio-Chrome Vibrio medium (BCVM) มีสีม่วง ในขณะที่โคโลนีของ *V. vulnificus*, *V. cholerae* และ *V. mimicus* จะมีสีเขียวอมฟ้า อาหาร BCVM มีความจำเพาะและถูกต้องมากกว่า TCBS (Duan และ Su, 2005) แต่วิธีนี้ยังเป็นเพียงวิธีตรวจสอบเชิงคุณภาพเท่านั้น

ถึงแม้ในปัจจุบันนี้จะมีการพัฒนาวิธีใหม่สำหรับใช้ตรวจสอบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างอาหาร แต่วิธีเหล่านี้ยังคงมีข้อด้อย คือส่วนใหญ่ยังเป็นวิธีที่มีความซับซ้อน ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญทางด้านเทคนิคสูง อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้มีราคาแพง และยังคงอยู่ในระดับงานวิจัย การนำวิธีการแทนใหม่ที่พัฒนาขึ้นมาไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมจึงยังคงมีไม่มากนัก

2.3 ควอรัมเซนซิง

ควอรัมเซนซิง เป็นการสื่อสารและการส่งสัญญาณประเภทหนึ่งของแบคทีเรีย โดยผ่านทางสัญญาณทางเคมีที่เรียกว่า ตัวเหนี่ยวนำอัตโนมัติ (autoinducers, AIs) ซึ่งตัวเหนี่ยวนำอัตโนมัติเหล่านี้เปรียบเหมือนภาษาของแบคทีเรียที่ใช้ในการสื่อสารทั้งภายในกลุ่มเดียวกันและระหว่างกลุ่ม โดยการส่งสัญญาณประเภทนี้มีกลไกการตอบสนองต่อเซลล์เมื่อเซลล์มีความหนาแน่นสูง (Anderson และคณะ, 2001) นั่นคือเมื่อเซลล์เจริญเพิ่มจำนวนและสร้างสัญญาณควอรัมเซนซิงออกมามากจนกระทั่งถึงระดับหนึ่งซึ่งมากกว่าระดับ threshold จะเกิดการเหนี่ยวนำกระบวนการทางพันธุกรรมและก่อให้เกิดการแสดงออกของฟีโนไทป์ในรูปแบบต่างๆ

มีงานวิจัยที่ศึกษาบทบาทของสัญญาณควอรัมเซนซิง โดยพบว่าสารนี้สามารถควบคุมการเรืองแสงทางชีวภาพได้ (Miller และ Bassler, 2001) การเกิดไบโอฟิล์ม (Zhu และ Mekalanos, 2003) การสร้างสปอร์ (Rudner และคณะ, 1991; Perego และ Hoch, 1996) การสร้างสารปฏิชีวนะ (Takano และคณะ, 2001; Derzelle และคณะ, 2002) การเหนี่ยวนำการก่อความรุนแรงในการก่อโรคในพืช (Dow และคณะ, 2003) หรือมนุษย์ (Bassler, 2002) การติดเชื้อใน host, การสร้างสาร bacteriocin (Hauge และคณะ, 1998) ตลอดจนเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์และสารอาหารในแบคทีเรีย (March และ Bentley, 2004) จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีการสร้างสัญญาณควอรัมเซนซิงที่ต่างกันออกไปเพื่อใช้ในการสื่อสาร อย่างไรก็ตามระบบการควบคุมสัญญาณควอรัมเซนซิงทุกๆชนิดนั้นมีรูปแบบที่เหมือนกัน อธิบายได้ดังต่อไปนี้

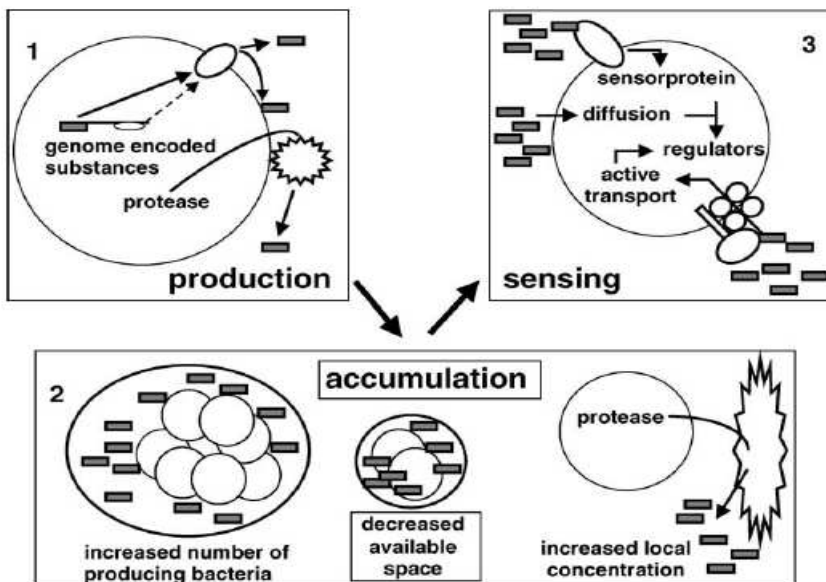
2.4 กลไกการทำงานของสัญญาณควอรัมเซนซิง

กลไกการทำงานของสัญญาณควอรัมเซนซิงในแบคทีเรีย แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ได้แก่ การผลิตสัญญาณควอรัมเซนซิง การสะสมสัญญาณควอรัมเซนซิง และการรับสัญญาณควอรัมเซนซิงแสดงดังรูปที่ 2.2 (Podbielski และ Kreikemeyer, 2004)

2.4.1 การผลิตสัญญาณควอรัมเซนซิง โมเลกุลสัญญาณจะถูกสร้างจากการแสดงออกของยีนที่จำเพาะ แล้วแพร่ผ่านทางเยื่อหุ้มเซลล์ออกไปสู่สิ่งแวดล้อม แต่มีบางโมเลกุลที่เกาะติดอยู่ที่พื้นผิวของเซลล์ของแบคทีเรีย

2.4.2 การสะสมสัญญาณควอรัมเซนซิง การสะสมเกิดขึ้นเนื่องมาจากการสร้างสัญญาณในอัตราที่คงที่ นอกจากนี้บางโมเลกุลที่สร้างขึ้นไม่สามารถแพร่ผ่านผนังเซลล์ออกไปได้ มีผลทำให้เกิดการสะสมสัญญาณควอรัมเซนซิงภายในเซลล์สูงขึ้น

2.4.3 การรับสัญญาณควอรัมเซนซิง แบคทีเรียจะรับสัญญาณจากภายนอกเซลล์ โดยสัญญาณจะเคลื่อนที่จากภายนอกเซลล์ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียด้วยการทำงานของ 2 กลไก คือ สัญญาณที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเซลล์โดยการแพร่ ส่วนสัญญาณที่มีขนาดของโมเลกุลใหญ่จะเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์โดยกระบวนการ active transport ในบางกรณี การรับสัญญาณจะเกิดขึ้นที่ผิวเซลล์โดยมีโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณ การรับสัญญาณของแบคทีเรียจะเกิดขึ้นเมื่อมีการสร้างสัญญาณออกมา แต่การแสดงออกของยีนที่จำเพาะจะเกิดขึ้นเมื่อมีปริมาณสัญญาณสูงถึงระดับ threshold level เท่านั้น



รูปที่ 2.2 ขั้นตอนการควบคุมสัญญาณควอรัมเซนซิง
ที่มา Podbielski และ Kreikemeyer (2004)

2.5 กลุ่มของสัญญาณควอรัมเซนซิง

Podbielski และ Kreikemeyer (2004) จำแนกระบบโมเลกุลสัญญาณควอรัมเซนซิงไว้ด้วยกัน 3 กลุ่ม (AI-1, AI-2 และ AI-3) โดยแบ่งกลุ่มตามโครงสร้างของโมเลกุล ดังต่อไปนี้

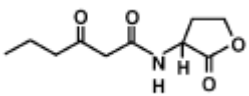
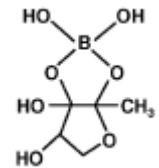
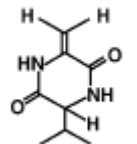
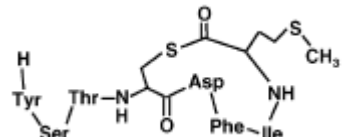
2.5.1 Acyl homoserine lactone (AI-1); เป็นสัญญาณควอรัมเซนซิงกลุ่มแรกที่มีรายงาน และมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง สัญญาณกลุ่มนี้ใช้ในการสื่อสารภายในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมลบ อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียแกรมลบบางชนิด เช่น *Pseudomonas aeruginosa* ใช้สัญญาณ AHL ในการสื่อสารกับแบคทีเรียต่างสายพันธุ์

2.5.2 Furanosyl borate หรือ nonboronated diester (AI-2); แบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกหลายชนิด เช่น *V. harveyi*, *V. cholerae* และ *Escherichia coli* สร้างสัญญาณควอรัมเซนซิงชนิดนี้ AI-2 เพื่อใช้ในการสื่อสารระหว่างกลุ่มจุลินทรีย์ การส่งสัญญาณไปยังเซลล์แบคทีเรียเกิดขึ้นจาก ribose transporter และระบบ membrane-located sensor ควอรัมเซนซิงชนิด Autoinducer-2 (AI-2) เป็นระบบที่มีความจำเพาะน้อยกว่าระบบ AI-1

2.5.3 Oligo- และ cyclic dipeptide (AI-3); สัญญาณควอรัมเซนซิง 2 ชนิดนี้เกิดมาจากการเปลี่ยนแปลงทางเคมีจากกลุ่มอื่นๆที่กล่าวมาแล้วข้างต้น สัญญาณ cyclic dipeptide สร้างจากแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิด โมเลกุลเหล่านี้จะแพร่ผ่านอย่างอิสระผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย oligopeptide สร้างจากทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ในแบคทีเรียแกรมบวก ระบบสัญญาณ oligopeptide (ขั้นตอนที่ 3, รูปที่ 2.2) เกิดขึ้นที่ผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ อย่างไรก็ตามในบางกรณี สัญญาณจะถูกลำเลียงแบบ active transport โดยเอนไซม์ permease และการรับสัญญาณจะเกิดขึ้นภายในเซลล์ของแบคทีเรีย oligopeptide เหล่านี้เป็นสัญญาณควอรัมเซนซิงที่สำคัญที่สุดในแบคทีเรียแกรมบวก

ตัวอย่างโครงสร้าง กลุ่มของแบคทีเรียที่สร้างสัญญาณควอรัมเซนซิง กระบวนการรับสัญญาณ และ บริเวณที่มีการรับสัญญาณ แสดงในตารางที่ 2.2

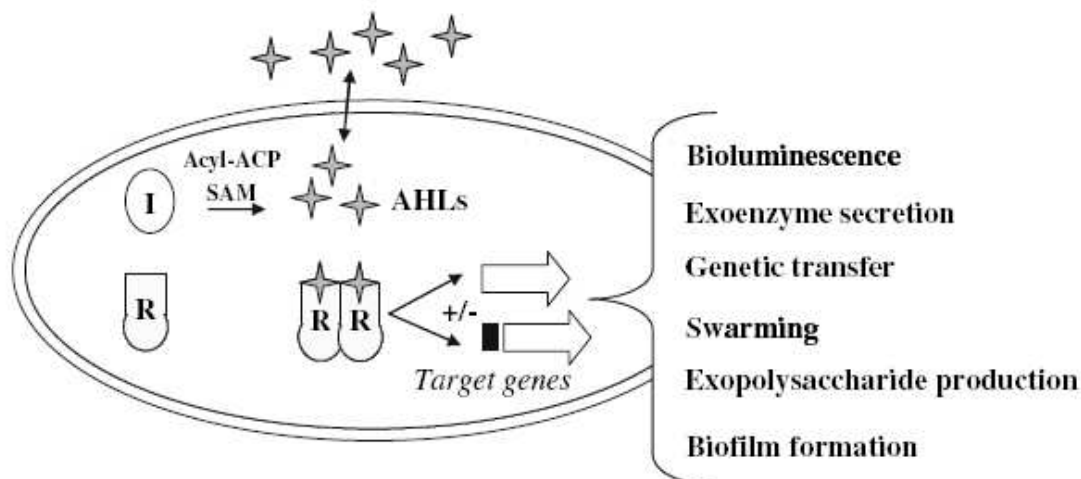
ตารางที่ 2.2 โมเลกุลสัญญาณควอรัมเซนซิง

กลุ่มของสัญญาณ	โครงสร้าง	แบคทีเรียที่สร้าง	กลไก	ตำแหน่งการรับสัญญาณ
AHL		แบคทีเรียแกรมลบ	การแพร่	Intracellular
AI-2		แบคทีเรียแกรมบวก/ แบคทีเรียแกรมลบ	active transport	extra / intracellular
cyclic dipeptides		แบคทีเรียแกรมลบ	การแพร่	intracellular
oligopeptides		แบคทีเรียแกรมบวก/ แบคทีเรียแกรมลบ	active transport	extra / intracellular

ที่มา Podbielski และ Kreikemeyer (2004)

2.6 ควอรัมเซนซิงชนิด AI-1

ระบบการสื่อสารชนิดนี้มีตัวส่งสัญญาณคือ acylated homoserine lactone (AHL) สร้างขึ้นโดยเอนไซม์ LuxI กลไกการทำงานดังแสดงในรูปที่ 2.3 กล่าวคือ ตัวส่งสัญญาณจะแพร่ผ่านเข้าออกจากเซลล์โดยผ่านทางเยื่อหุ้มเซลล์ และจะถูกสะสมอยู่ทั้งภายในและภายนอกเซลล์โดยปริมาณ AHL จะแปรผันตามปริมาณเซลล์แบคทีเรีย เมื่อมีการสะสมจนกระทั่ง AHL มีความเข้มข้นสูงถึงระดับหนึ่ง (threshold level) โปรตีน LuxR ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณจะเชื่อมต่อกับ AHL เกิดเป็น LuxR-AHL complex จากนั้นสารประกอบเชิงซ้อนดังกล่าวจะไปเชื่อมต่อกับ promoter ของยีนเป้าหมายที่ทำหน้าที่ควบคุมสัญญาณควอรัมเซนซิง เพื่อกระตุ้นการถอดรหัส (transcription) และก่อให้เกิดการแสดงออกของฟีโนไทป์ในรูปแบบต่างๆ

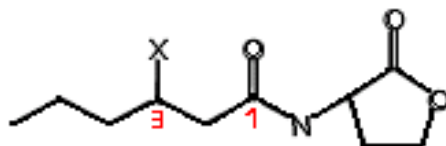


รูปที่ 2.3 ระบบสัญญาณควอรัมเซนซิงชนิด AI-1

ที่มา Valenzuela และคณะ (2007)

โครงสร้างของสาร AHL เป็นสายโซ่เอซิดเชื่อมต่อกับวงแหวนแลกโทน (แสดงในรูปที่ 2.4) สามารถละลายได้ดีในไขมันจึงแพร่ผ่านเข้า-ออกผนังเซลล์จลินทรีย์ได้ ความแตกต่างของชนิดสาร AHL ขึ้นกับความยาวของสายโซ่เอซิด พันธะคู่ที่ตำแหน่งต่างๆ และ/หรือหมู่แทนที่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ภายในสายโซ่ คาดว่าสายโซ่เอซิดน่าจะมาจากเมตาบอลิซึมของกรดไขมัน ส่วนวงแหวนแลคโตนนี้น่าจะมาจากเมตาบอลิซึมของกรดอะมิโน (Morin และคณะ, 2003) ซึ่งในแบคทีเรียแกรมลบแต่ละสายพันธุ์จะสร้างสาร AHL ที่มีความแตกต่างกันออกไป และแบคทีเรีย

สายพันธุ์หนึ่งอาจสร้างสาร AHL มากกว่า 1 ชนิดก็ได้ ซึ่งแต่ละชนิดจะก่อให้เกิดการแสดงออกของฟีโนไทป์ที่แตกต่างกันแสดงดังตารางที่ 2.3



รูปที่ 2.4 โครงสร้างทั่วไปของ N-3-acylated homoserine lactone
ที่มา Gram และคณะ (2002)

ในปี 2003, Flodgaard และคณะพบว่าสาร AHL จะมีความเสถียรลดลงเมื่อภาวะแวดล้อมมีความเป็นด่างมากขึ้น (ค่า pH สูงกว่า 7.5) และเมื่อค่าพีเอชเพิ่มจาก 7.1 เป็น 8.5 วงแหวนแลกโทนจะถูกไฮโดรไลซ์ภายใน 24 ชั่วโมง นอกจากนี้โครงสร้างของ AHL ก็มีผลต่อความเสถียรด้วย โดยความเสถียรของสาร AHL จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีความยาวของสายโซ่เอซิลมากขึ้น และถ้าไฮโดรเจนของคาร์บอนที่ตำแหน่งที่ 3 ของสายโซ่ถูกแทนที่ด้วยออกซิเจน ก็จะทำให้ความเสถียรลดลง (Yates และคณะ, 2002)

ตารางที่ 2.3 : ตัวอย่างการควบคุมการแสดงออกทางฟีโนไทป์ของ AHL ในแบคทีเรียแกรมลบ

ชนิดของแบคทีเรีย	สัญญาณที่สร้าง	การแสดงออกทางฟีโนไทป์	แหล่งที่มา
<i>Aeromonas hydrophila</i>	C4-HSL	serine protease and metalloprotease production	Swift และคณะ, 1997
<i>Ae.salmonicida</i>	C4-HSL	exoprotease production	Swift และคณะ, 1999
<i>A.tumefaciens</i>	3-oxo-C8-HSL, C4-HSL	Ti-plasmid conjugation transfer	Piper และคณะ, 1993
<i>Berkholdaria cepacia</i>	C8-HSL	protease and siderophore production	Lewenza และคณะ, 1999
<i>Chromobacterium violaceum</i>	C6-HSL	violacein pigment, hydrogen cyanide, antibiotics, exoprotease and chitinolytic enzyme	Chernin และคณะ, 1998
<i>Erwinia carotovora</i>	3-oxo-C6-HSL	Carbapenem antibiotic synthesis (through Carl/R)	Jones และคณะ, 1993,
	3-oxo-C8-HSL	exoenzyme synthesis (through Expl/R)	Bainton และคณะ, 1992
<i>E.chrysanthemii</i>	3-oxo-C6-HSL, C6-HSL	regulator of pectinase synthesis	Nasser และคณะ, 1998
<i>Pseudomonas aerofaciens</i>	3-oxo-C6-HSL, 3-oxo-C12-HSL	Phenazine antibiotic biosynthesis	Wood และคณะ, 1997

ตารางที่ 2.3 : ตัวอย่างการควบคุมการแสดงออกทางฟีโนไทป์ของ AHL ในแบคทีเรียแกรมลบ (ต่อ)

ชนิดของแบคทีเรีย	สัญญาณที่สร้าง	การแสดงออกทางฟีโนไทป์	แหล่งที่มา
<i>P.aeruginosa</i>	3-oxo-C12-HSL, C4-HSL	Virulence and biofilm development	Pearson และคณะ, 1994
<i>Rhizobium etli</i>	multiple, unconfirmed	restriction of nodule number	Pearson และคณะ, 1995
<i>R.leguminosarum</i>	C6-HSL, C8-HSL	nodulation	Rosemeyerและคณะ,1998
<i>Serratia liquefaciens</i>	C4-HSL	swarmer cell differentiation, exoprotease	Cubo และคณะ, 1992
<i>Vibrio anguillarum</i>	3-oxo-C10-HSL	unknown	Eberl และคณะ, 1996
<i>V.fischeri</i>	3-oxo-C6-HSL, C8-HSL	luminescence and colonization	Milton และคณะ, 2006
<i>V.harveyi</i>	3-OH-C4-HSL	bioluminescence, exopolysaccharide production, siderophore and metalloprotease	Lupp และ Ruby, 2004 Bassler และคณะ,1993
<i>Yersinia enterocolitica</i>	C6-HSL	unknown	Throup และคณะ, 1995
<i>Y.pseudotuberculosis</i>	C8-HSL	unknown	Atkinson และคณะ, 1999

2.7 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสร้าง AHL ในแบคทีเรียแกรมลบ

มีงานวิจัยมากมายที่ศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสร้างสาร AHL ในแบคทีเรีย ประกอบด้วยปัจจัยภายใน (สายพันธุ์และช่วงการเจริญ) และปัจจัยภายนอก (อุณหภูมิและองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ) (Atkinson และคณะ, 1999, Geisenberger และคณะ, 2000; Lithgow และคณะ., 2001, Blosser-Middleton และ Gray, 2001, Byers และคณะ, 2002) ดังจะได้อธิบายต่อไปนี้

ปัจจัยแรก คือ ช่วงการเจริญ โดย Yates และคณะ (2002) พบว่าสาร C6-HSL และ 3-oxo-C6-HSL ที่สร้างจาก *Y. pseudotuberculosis* จะตรวจพบได้ในช่วงกลางและปลายของ log phase ในปริมาณที่มากกว่าในช่วง stationary phase เช่นเดียวกับ *P. aeruginosa* ที่ตรวจพบการสร้าง C4-HSL และ 3-oxo-C12-HSL ในช่วง log phase ในปริมาณที่มากกว่าช่วง stationary phase ผู้วิจัยอธิบายไว้ว่าปริมาณ AHL ที่ลดลงเนื่องมาจากการแตกสลายในภาวะที่เป็นเบส การปล่อยสารแอมโมเนียออกมาจากเซลล์ในระหว่างการเจริญมีผลให้ pH ในอาหารสูงขึ้น ดังนั้นวงแหวนแลกโทนในโมเลกุลของ AHL จึงไม่เสถียรและเกิดการแตกวงแหวนภายใต้สภาวะที่เป็นด่าง (Byers และคณะ, 2002) ดังนั้นปริมาณ AHL ที่ตรวจวัดได้ในช่วงการเจริญนี้จึงลดลงในแบคทีเรียบางชนิด อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าปัจจัยด้านช่วงการเจริญในจุลินทรีย์บางชนิดไม่ได้มีอิทธิพลต่อการสร้าง AHL เช่น *S. proteamaculans* strain B5a (Flodgaard และคณะ, 2003)

ปัจจัยต่อมา คือ อุณหภูมิ ซึ่งเป็นปัจจัยภายนอกที่มีรายงานว่าอิทธิพลต่อปริมาณ AHL โดย Schaefer และคณะ (1996) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ของ LuxI ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสร้าง autoinducer โดยพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือ 20-30 องศาเซลเซียส ต่อมา Atkinson และคณะ (1999) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการสร้าง AHL ของ *Y. pseudotuberculosis* พบว่ารูปแบบการสร้าง AHL ของแบคทีเรียชนิดนี้มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ Gram และคณะ (1999) พบว่า ภายใต้สภาวะอุณหภูมิต่ำและที่ pH < 7 ซึ่งเป็นระดับ pH ที่พบทั่วไปในผลิตภัณฑ์อาหาร จะช่วยรักษาความเสถียรของ AHL ทำให้มีการสะสมที่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งก็สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yates และคณะ (2002) ว่าความเสถียรของ AHL จะลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 22 ไปถึง 37 องศาเซลเซียส

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยภายนอกอีกปัจจัยหนึ่งที่พบว่ามีอิทธิพลต่อการสร้าง AHL ในแบคทีเรียบางชนิด เช่น *R. leguminosarum* (Geisenberger และคณะ, 2000; Lithgow และคณะ, 2001) เช่นเดียวกับการสร้าง C4-HSL ของ *Ae. hydrophila* ก็ขึ้นอยู่กับ

คุณหมุมิและองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในแง่ของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (Martinez และคณะ, 2005).

2.8 ควอรัมเซนซิงในจีแนส *Vibrios*

มีรายงานการตรวจพบระบบสัญญาณควอรัมเซนซิงในแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* อยู่หลายสายพันธุ์ (Freeman และ Bassler, 1999; Camara และคณะ, 2002; Kim และคณะ, 2003) โดยพบว่าสัญญาณเหล่านี้ก่อให้เกิดการแสดงออกของฟีโนไทป์ เช่นการเรืองแสงทางชีวภาพใน *V. fischeri* และ *V. harveyi* ยีน *luxRI* และ *luxMN* มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างโมเลกุลสัญญาณชนิด AI-1 (หรือ acylated homoserine lactones, AHL) โดยควบคุมการถอดรหัสใน *V. fischeri* และ *V. harveyi* ตามลำดับ ในขณะที่ *luxSP/Q* มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างโมเลกุลควอรัมเซนซิงชนิด AI-2 (หรือ furanosyl borate diester) ในแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ (Bassler และคณะ, 1993; Schauder และคณะ, 2001)

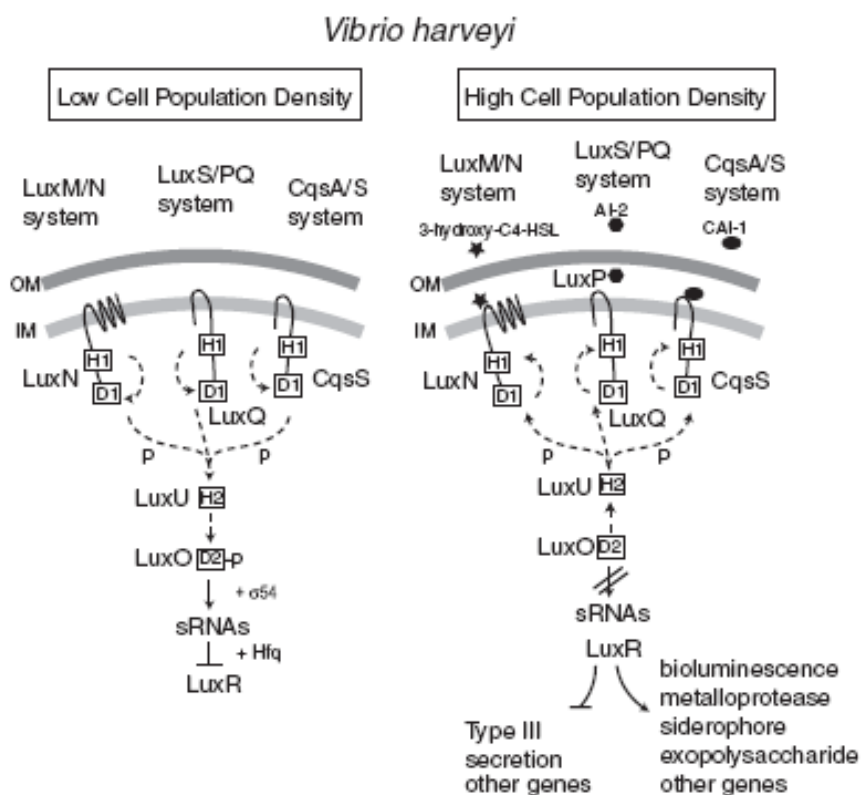
2.8.1 ควอรัมเซนซิงใน *V. harveyi*

V. harveyi เป็นแบคทีเรียที่เรืองแสงได้ มีความเกี่ยวข้องกับการก่อโรคในกุ้งและปลาหลายชนิด (Liu และ Lee, 1999) ระบบควอรัมเซนซิงใน *V. harveyi* ประกอบด้วย 3 ระบบที่ใช้ควบคุมการสร้างสารเรืองแสงทางชีวภาพ (bioluminescence) และสารอื่นๆ ได้แก่ metalloprotease, siderophore, และ exopolysaccharide (Bassler และคณะ, 1993; ; Lilly และ Bassler, 2000; Mok และคณะ, 2003 และ Henke และ Bassler, 2004) นอกจากนี้ยังพบว่าควอรัมเซนซิงควบคุมระบบ type III secretion (TTS) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการก่อความรุนแรงในการก่อโรคของแบคทีเรียด้วย

รูปแบบของระบบสัญญาณควอรัมเซนซิงของ *V. harveyi* แสดงในรูปที่ 2.5 ระบบ LuxM/N ใช้ N-(3-hydroxybutanoyl)-L-homoserine lactone (3-hydroxy-C4-HSL) เป็นโมเลกุลสัญญาณชนิด AI-1 ระบบ LuxS/PQ ใช้ 3A-methyl-5,6-dihydro-furo(2,3D)(1,3,2) dioxaborole-2,2,6,6A-tetraol เป็นสัญญาณชนิด AI-2 ระบบ AI-1 มีความจำเพาะสูง จึงใช้เป็นระบบการสื่อสารภายในสายพันธุ์เดียวกัน (intraspecies communication) ในขณะที่ AI-2 นั้นเป็นระบบที่มีความจำเพาะน้อยกว่า และพบว่ามีระบบการสื่อสารนี้ในแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ จึงมีข้อสันนิษฐานว่าเป็นระบบที่ใช้ในการสื่อสารของแบคทีเรียข้ามสายพันธุ์ (interspecies communication) ระบบสุดท้ายคือ CqsA/S ใช้โมเลกุลสัญญาณ CAI-1 ซึ่งยังไม่ทราบโครงสร้าง

ทางเคมีของสัญญาณชนิดนี้ โมเลกุลของสัญญาณแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกัน แต่จะทำงานร่วมกันในการควบคุมการแสดงออกของยีน

ภายใต้สภาวะที่มีจำนวนเซลล์ต่ำ และไม่มีการปรากฏสัญญาณควอรัมเซนซิง ยีน *luxN*, *luxQ* และ *cqsS* จะเกิดการย้ายหมู่ฟอสเฟตไปอยู่ที่ phosphotransferase (LuxU) แล้ว LuxU จะโอนถ่ายหมู่ฟอสเฟตไปตอบสนองต่อ regulator domain คือ LuxO เกิดเป็น phosphor-LuxO ซึ่งจะยับยั้งการแสดงออกของยีน *luxR* ส่วนที่จำนวนเซลล์สูงๆ ยีน *luxN*, *luxQ* และ *cqsS* จะสร้างโมเลกุลของสัญญาณแล้วไปเชื่อมต่อกับตัวรับสัญญาณ โดยโมเลกุล 3-hydroxy-C4-HSL และ CAI-1 จะเชื่อมต่อโดยตรงกับ LuxN และ CqsS ตามลำดับ โมเลกุลของ AI-2 ในขั้นตอนแรกจะจับกับ periplasmic protein LuxP ก่อนที่จะเชื่อมต่อกับ LuxQ ซึ่งกระบวนการเหล่านี้ทำให้เกิดการยับยั้งกิจกรรมของ LuxO ดังนั้น LuxR จึงถูกแปรรหัส โดย LuxR จะเชื่อมต่อกับโปรโมเตอร์ของ *luxCDABE* เกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดการเรืองแสงทางชีวภาพและพีโนไทป์อื่นที่กล่าวนมาแล้วข้างต้น นอกจากนี้ LuxR ยังควบคุมการแสดงออกของกลุ่มยีนที่เป็นรหัส (encoding) ระบบ TTS ซึ่งเกี่ยวข้องกับการก่อความรุนแรงในแบคทีเรีย โดยควอรัมเซนซิงจะยับยั้งระบบ TTS เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะที่มีจำนวนเซลล์สูง (Milton, 2006)



รูปที่ 2.5 ระบบสัญญาณควอรัมเซนซิงใน *V. harveyi*

ที่มา Milton (2006)

2.8.2 ควอรัมเซนซิงใน *V. cholerae*

V. cholerae เป็นจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในมนุษย์ ก่อให้เกิดโรคอหิวาตกโรค (Colwell, 2004) ลักษณะเด่นของโรคนี้คือ อูจจาระของผู้ป่วยจะมีสีขุ่นเหมือนน้ำข้าวขำ เป็นผลมาจากการสร้างสารพิษ cholera (CT) โดย CT หรือ ADPribosylating toxin เป็นสารพิษที่ก่อความรุนแรงมาก (Kaper และคณะ, 1994 และ Dickinson และ Lencer, 2003)

ตามรายงานของ Miller และคณะ(2002) การควบคุมสัญญาณควอรัมเซนซิงใน *V. cholerae* จะคล้ายกับระบบสัญญาณของ *V. harveyi* โดยประกอบด้วยระบบ AI-2 LuxS/PQ, CqsA/S ส่วนระบบที่ 3 ยังไม่พบการรายงานถึงลักษณะของสัญญาณในระบบนี้ *V. cholerae* ไม่ปรากฏการสร้างสัญญาณชนิด AI-1 บ่งชี้ให้เห็นว่าไม่สื่อสารในกลุ่ม AHL แต่พบว่ามีการทำงานของ LuxS/PQ และ CqsA/S เหมือนกับที่พบใน *V. harveyi* (Milton และคณะ, 2006) พบการควบคุมของยีน *luxU*, *luxO* และ *luxR* เหมือนกับที่พบใน *V. harveyi* แต่มีความแตกต่างอยู่เล็กน้อยในส่วนของ LuxR จะเปลี่ยนเป็น HapR ใน *V. cholerae* (Camara และคณะ, 2002) ในระบบที่ 3 มีความเชื่อว่าน่าจะเชื่อมต่อกับ LuxO โดยตรง และกระตุ้นการทำงานของ single regulatory cascade

2.8.3 ควอรัมเซนซิงใน *V. vulnificus*

V. vulnificus เป็นแบคทีเรียก่อโรคในน้ำทะเล ซึ่งก่อให้เกิดโรค vibriosis ในคนและปลา แบ่งสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ชนิดนี้ได้เป็น 3 biotype โดยสายพันธุ์ที่ก่อความรุนแรงในปลาจัดอยู่ใน biotype 2 ในปี 2001, McDougald และคณะ รายงานว่า *V. vulnificus* สร้างระบบควอรัมเซนซิงชนิด AI-2 เช่นเดียวกับที่พบใน *V. harveyi* โดยตรวจพบยีน *luxU*, *luxO*, *luxR* และ *SmcR* กลไกการสร้างสัญญาณควอรัมเซนซิงใน *V. vulnificus* มีรูปแบบเดียวกับที่พบใน *V. harveyi* (Lenz และคณะ, 2004)

สัญญาณควอรัมเซนซิงชนิด furanosyl borate diester หรือ autoinducer 2 (AI-2) พบใน biotype 1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรคในคน Valiente และคณะ (2009) แสดงให้เห็นว่ายีน *luxS* เป็นตัวสร้างสัญญาณ AI-2 โดยจะพบ AI-2 ใน *V. vulnificus* ทุกสายพันธุ์ ทุก biotype และ serovar นอกจากนี้ยังพบว่า *V. vulnificus* สร้างสัญญาณควอรัมเซนซิงชนิด acylated homoserine lactone (AHL) หรือ AI-1 ด้วย โดยพบสาร AHL ใน biotype 1 และ 2 ที่แยกได้จากน้ำคนและปลาที่มีอาการติดเชื้อทางบาดแผล แต่ไม่พบในสายพันธุ์ที่แยกได้จากคนที่มีอาการติดเชื้อในกระแสเลือด มีการทดลองบ่งชี้สารประกอบ AHL ด้วยวิธีทางชีวภาพ และ HPLC-MS พบว่าเป็นชนิด N-butanoyl-homoserine-lactone (C4-HL) โดยจะตรวจพบสาร C4-HL เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารอาหารต่ำ แต่จะไม่พบการสร้างสารนี้ในแหล่งที่มีสารอาหารสูง

2.8.4 ควอรัมเซนซิงใน *V. parahaemolyticus*

หลักฐานแรกที่พบระบบสัญญาณควอรัมเซนซิงใน *V. parahaemolyticus* รายงานโดย Greenberg และคณะ ในปี 1979 เสนอไว้ว่า culture fluid ของ *V. parahaemolyticus* เหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน *lux* ใน *V. harveyi* ได้ งานวิจัยของ Greenberg มีข้อมูลสนับสนุนโดย Bassler และคณะ ในปี 1997 ซึ่งศึกษาการเหนี่ยวนำการเรืองแสงทางชีวภาพข้ามกลุ่มใน *V. harveyi* ผลการทดลองพบว่า *V. parahaemolyticus* สร้างสารซึ่งเหนี่ยวนำระบบสัญญาณทั้งระบบ AI-1 และระบบ AI-2 ใน *V. harveyi* โดยโมเลกุลที่เหนี่ยวนำ *V. harveyi* AI-1 (3-hydroxy-C4-HSL) สามารถสกัดได้โดยใช้ตัวทำละลายสารอินทรีย์ และระบบ AI-1 มีความจำเพาะและความไวสูงกว่าระบบ AI-2

ในปี 2004 Henke และ Bassler ทำการทดลองเพื่อศึกษาเอ็นที่ควบคุมการสร้างสัญญาณควอรัมเซนซิงและการควบคุมกลุ่มยีน TTS ใน *V. harveyi* และมีการเปรียบเทียบกับลำดับยีนของ *V. parahaemolyticus* ผลการทดลองพบว่า ระบบลำดับนิวคลีโอไทด์เบสของยีน TTS ใน *V. parahaemolyticus* เหมือนกับใน *V. harveyi* และนอกจากนี้ยังพบว่า *V. parahaemolyticus* มียีน *lux* ทุกชนิดที่ใช้ในการสร้างสัญญาณควอรัมเซนซิงเช่นเดียวกับ *V. harveyi* ประกอบด้วย *luxM*, *luxR* (ระบบ AI-1; 3-hydroxy-C4-HSL) และ *luxS* (ระบบ AI-2) ดังนั้น *V. parahaemolyticus* จึงน่าจะสร้างสัญญาณ N-(3-hydroxybutanoyl)-L-homoserine lactone (3-hydroxy-C4-HSL) เป็นโมเลกุลสัญญาณชนิด AI-1 และน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับ การควบคุมการแสดงออกของยีนในการก่อความรุนแรงของแบคทีเรียเช่นเดียวกับ *V. harveyi*

2.9 วิธีการตรวจสอบ AHL

2.9.1 การตรวจสอบทางชีวภาพ (Bioassay)

Bioassay อาศัยหลักความจำเพาะของเอ็นต่อสาร AHL โดยใช้แบคทีเรียตรวจวัด (monitor strain) เป็นตัวตรวจสอบ แสดงดังตารางที่ 2.4 ซึ่งจะทำหน้าที่เหมือนเป็นตัวรับสัญญาณ AHL ที่สร้างจากแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น และเกิดการแสดงออกในรูปของการเรืองแสงทางชีวภาพ (bioluminescence) หรือการสร้างสารสี โดยทั่วไปแบคทีเรียที่นิยมใช้เป็นตัวตรวจวัดได้แก่ (i) *Escherichia coli* ที่มีพลาสมิด pSB403 (Andersen และคณะ, 2001) (ii) *Chromobacterium violaceum* CV026 (Ravn และคณะ, 2001) (iii) *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4) (Singh และ Greenstein, 2005) แบคทีเรียตรวจวัดแต่ละชนิดจะมีความไวต่อสาร AHL แตกต่าง กัน

ข้อเสียของวิธีนี้คือ 1) วิธี bioassay เหมาะสมกับการใช้ในระดับงานวิจัยเท่านั้น เนื่องจากวิธีนี้ต้องการผู้เชี่ยวชาญที่มีทักษะ และ monitor strains เป็นการดัดแปรทางพันธุกรรมที่ไม่เสถียร 2) สำหรับการใช้งานในตัวอย่างจริง จะต้องใช้ monitor strains มากกว่า 2-3 สายพันธุ์ขึ้นไป 3) ระยะเวลาที่ในการตรวจสอบทั้งหมดค่อนข้างนาน มากกว่า 2 วัน

ตารางที่ 2.4 monitor strains และการตอบสนองต่อโมเลกุลสัญญาณ AHL

ปี	ผู้วิจัย	indicator strains	การตอบสนอง
1998	Winson และคณะ	<i>E. coli</i> MT102	bioluminescence
2000	Blosser และ Gray	<i>C. violaceum</i> CV0blu	purple color
2001	Andersen และคณะ	<i>E. coli</i> MT102	green fluorescence
2002	Middleton และคณะ	<i>E. coli</i> JM109	bioluminescence
2003	Jacobi และคณะ	<i>E. coli</i> (pSB403)	bioluminescence
2004	Jafra และ Wolf	<i>E. coli</i> JB534-MT102	green fluorescence
2005	Chambers และคณะ	<i>A. tumefaciens</i> A136	blue color
2005	Singh และ Greenstein	<i>A. tumefaciens</i> NTL4	blue color

2.9.2 Thin layer chromatography (TLC)

การตรวจสอบและบ่งชี้โมเลกุลสัญญาณ AHL ด้วยวิธี TLC อาศัยหลักการความแตกต่างของความยาวของสายโซ่เอซิล และหมู่แทนที่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 โมเลกุลของ AHL จะถูกแยกด้วยแผ่น TLC และตรวจผลโดยการเทคัลเจอร์ของ indicator strains ลงบนผิวหน้าของแผ่น TLC

การใช้เทคนิค TLC ในตรวจสอบและการบ่งชี้โมเลกุลสัญญาณ AHL เริ่มต้นในปี 1997 โดย Shaw และคณะ พัฒนารูปวิธีโดยใช้แผ่น TLC แบบ C18 reversed-phase และใช้ *A. tumefaciens* strain NT1 (pDCI41E33) เป็น indicator strains ทำการทดสอบในสาร AHL มาตรฐาน วิธีนี้สามารถแยกสารจากตัวอย่างได้เป็นสารมาตรฐาน 10 ชนิด ความไวของวิธีนี้เมื่อใช้ตรวจสอบสารมาตรฐานอยู่ที่ระดับพิโคโมล อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของวิธีนี้คือ ควรมี indicator strains ที่ใช้ในการตรวจสอบโมเลกุล AHL หลายชนิด เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ถูกต้อง และวิธีนี้เป็นการตรวจวิเคราะห์อย่างคร่าวๆในเชิงคุณภาพ ไม่สามารถระบุความเข้มข้นของสารที่แยกได้ และการแปลผลต้องใช้ความชำนาญ อีกทั้งมักเกิดรอย smear เป็นหางยาว หากมีการปนเปื้อนของสารอื่น

2.9.3 Liquid chromatography- mass spectrometry (LC-MS)

High performance liquid chromatography (HPLC) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสำหรับใช้ในการจำแนกโมเลกุลของ AHL ออกจากตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบ และสำหรับเตรียมโมเลกุล AHL สำหรับการวิเคราะห์ Bainton และคณะ (1992) และ Chhabra และคณะ (1993) ใช้คอลัมน์ C18 reversed-phase และ isocratic mobile phase (เช่น acetonitrile-water) ในการแยกโมเลกุล AHL โมเลกุลที่ถูกแยกแล้วจะผ่านเข้าสู่เครื่อง MS และ nuclear magnetic resonance spectroscopy สำหรับการบ่งชี้โครงสร้าง

ตั้งนั้นในเวลาต่อมาจึงมีการใช้เทคนิค LC-MS ในการวิเคราะห์โมเลกุล AHL กันอย่างกว้างขวาง และมีการดัดแปรสภาพให้เหมาะสม Frommberger และคณะ (2004) พัฒนาอุปกรณ์ที่สามารถใช้ได้ทั้งการทำให้ตัวอย่างมีความเข้มข้นขึ้น (pre-concentration) และการแยกสาร โดยใช้ reversed-phase nano-liquid chromatography column ร่วมกับ microelectrospray - ionization ion trap mass spectrometry ทำให้วิธีนี้มีความถูกต้องและมีประสิทธิภาพมากขึ้น

Bruhn และคณะ (2004) ใช้ C18 reversed-phase HPLC column ร่วมกับ positive-electrospray high-resolution mass spectroscopy ในการตรวจสอบ 3-oxo-hexanoyl homoserine lactone (3-oxo-C6-HSL) ในคัลเจอร์บริสุทธิ์ของ *Hafnia alvei*

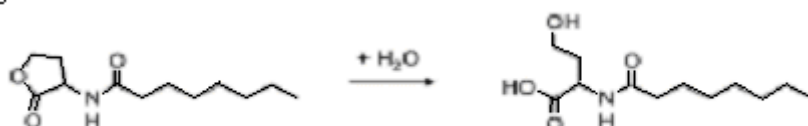
วิธีนี้ใช้วิเคราะห์ได้ทั้งทางด้านคุณภาพและปริมาณ มีความไวและความจำเพาะสูง ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น

2.9.4 Colorimetry

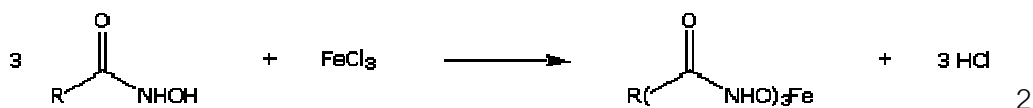
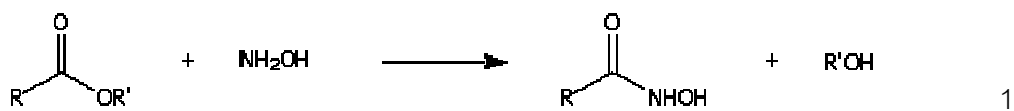
Yang และคณะ (2006) พัฒนาวิธีการใหม่สำหรับตรวจสอบ AHL ด้วยวิธี colorimetry วิธีนี้ดัดแปลงมาจากงานวิจัยของ Goddu และคณะ (1955) ซึ่งพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารที่มีหมู่ ester, anhydrides และอนุพันธ์ของกรด carboxylic วิธี colorimetry ที่พัฒนาได้นี้ สามารถตรวจสอบโมเลกุลของ AHL ในตัวอย่างได้อย่างรวดเร็ว ง่าย และใช้เพียง spectrophotometer เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบ

วิธี colorimetry อาศัยหลักการการทำปฏิกิริยาของหมู่ lactone กับ ferric chloride ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจากสีเหลืองเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำตาล หมู่ lactone เป็นผลิตภัณฑ์ของ cyclic ester ที่ประกอบด้วยหมู่ alcohol และหมู่ carboxylic ภายในโมเลกุล มีงานวิจัยมากมายที่แสดงให้เห็นว่าในโครงสร้างของ AHL ทุกชนิดจะมีหมู่ lactone ปรากฏอยู่เสมอ (Miller และ Bassler, 2001; Fuqua และ Greenberg, 2002; Jacobi และคณะ, 2003; Buchholtz และคณะ, 2005; Pillai และ Jesudkasan, 2006)

ภายใต้ภาวะที่เป็นต่าง ด้วย sodium hydroxide หมู่ lactone ในโครงสร้างของ AHL จะถูก hydrolyze เป็นเอสเทอร์สายตรง (รูปที่ 2.6) เมื่อวงแหวนแลกโทนเปิด หมู่ carboxyl ตรงส่วนของ homoserine จะทำปฏิกิริยากับ hydroxylamine เกิดเป็นสาร hydroxamic acid (รูปที่ 2.7a) (Goddu และคณะ, 1955; Yang และคณะ, 2006) ผลิตภัณฑ์ hydroxamic acid จะทำปฏิกิริยากับ ferric chloride ในระบบแล้วเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีซึ่งตรวจวัดโดย spectrophotometer (รูปที่ 2.7b)



รูปที่ 2.6 การแตกสลายของ AHL ภายใต้ภาวะต่าง โดย N-octanoly-D/L-homoserine lactone ถูก hydrolyze ภายใต้ภาวะที่เป็นต่าง ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ N-octanoly-D/L-homoserine ที่มา Englmann และคณะ (2007)

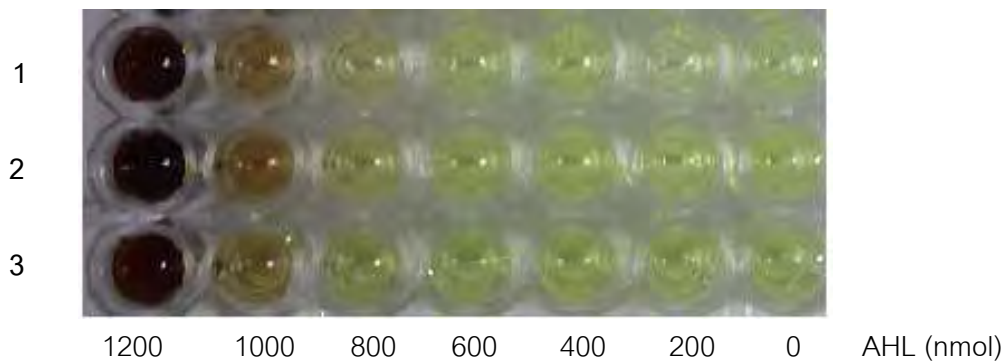


รูปที่ 2.7 ปฏิกิริยา colorimetry ของ AHL ที่ถูก hydrolyze แล้ว โดย 1 ; ปฏิกิริยาของเอสเทอร์สายตรงกับ hydroxylamine เกิดเป็น hydroxamic acid และ 2; ปฏิกิริยา colorimetry ของ hydroxamic acid กับ ferric chloride ผลิตภัณฑ์สารประกอบเชิงซ้อนสีที่เกิดขึ้นสามารถตรวจวัดโดย spectrophotometer

ที่มา Glagovich, Organic Qualitative Analysis Outline : online

จากรูปที่ 2.8 สารประกอบเชิงซ้อนของ ferric กับ aliphatic hydroxamic acid ส่วนใหญ่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นประมาณ 530 นาโนเมตร ($\lambda_{\max} \sim 530 \text{ nm}$) แต่สารประกอบเชิงซ้อนของ ferric กับ ester ที่มี conjugated double bond หรือ มีหมู่ carboxyl มากกว่า 1 หมู่ จะให้ค่า λ_{\max} ที่ความยาวคลื่นแตกต่างกันเล็กน้อย (Goddu และคณะ, 1955) สารประกอบเชิงซ้อนของ AHL ที่อยู่ภายใต้ภาวะที่เป็นต่างกับ ferric สารละลายจะมีสีเหลืองถึงสี

น้ำตาล และมีค่า λ_{\max} ที่ความยาวคลื่นประมาณ 520 นาโนเมตร สีของสารละลายขึ้นอยู่กับปริมาณของวงแหวนแลกโตน



รูปที่ 2.8 สีของสารประกอบเชิงซ้อน ferric-AHL complex ตามความเข้มข้นของ AHL ในช่วง 0 ถึง 1200 นาโนโมล แถวที่ 1; 2-hexanoyl-3-hydroxymethyl butanolide, แถวที่ 2; 2-(6-methyl-1-hydroxyheptyl)-3-hydroxymethyl butanolide, แถวที่ 3; N-3-oxooctanoyl-homoserine lactone (3-oxo-C10-HSL)

ที่มา Yang และคณะ (2006)

บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

วัตถุดิบ

อาหารทะเลสดที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ กุ้ง ปลาหมึก ปลา และหอยนางรม ซึ่งจากซูเปอร์มาเก็ตหลายแห่ง และส่วนหนึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท ไทยเดลมาร์ จำกัด

เครื่องมือและอุปกรณ์

- 1) Biomedical freezer, Sanyo MDF 236, Japan
- 2) Colony counter, Gallenkamp, Germany
- 3) Vortex mixer, Lab-line Instrument Inc., USA
- 4) Laminar flow hood, BVT 123 Iasco, USA
- 5) Centrifuge, Micro22R Hettich, Germany
- 6) Microwave, KOR-63-D7 Daewoo, Korea
- 7) Incubator shaker, SW23 Julabo, USA
- 8) Spectrophotometer, V530 Jasco, USA
- 9) Spectrophotometer , Lambda 25 UV/VIS spectrometer, PerkinElmer, USA
- 10) Balance, AB 204 Mettler Toledo, Switzerland
- 11) Balance , RP 310S Satorious, Germany
- 12) HPLC, 600 Waters, USA
- 13) HPLC software, Empower software Waters, Ireland
- 14) Computer, IBM, USA
- 15) Microsyringe 250 μ l, MS R250, Ito corp., Japan
- 16) Gyrotory shaker, Model G2 New Brunswick Scientific, USA
- 17) Incubator shaker, Lab-line Instrument Inc., USA
- 18) Autoclave, SS320 Tomy, USA
- 19) Hot-air oven, Binder, Germany
- 20) Micropipette P 200 และ P 1000 (Gilson, France)
- 21) Luna C18(2) 100A. 150 x 4.6 mm HPLC column, Phenomenex, USA

- 22) Security guard semi-prep guard cartridge system 10mm ID for HPLC column, Phenomenex, USA
- 23) 0.45 μm filter membrane (Nylon) (Kanto Chemical, Japan)
- 24) Cotton swobs, Thai Gauze co., LTD., Thailand
- 25) Syringe 3 ml, BD, Singapore

สารเคมี

- 1) Sodium chloride, analytical grade, Ajax Finechem, USA
- 2) Sodium hydroxide, analytical grade, Merck, Germany
- 3) Ferric chloride, analytical grade, Asia Pacific Specially Chemical Limited, Singapore
- 4) Ammonium ferric perchlorate, analytical grade, Asia Pacific Specially Chemical Limited, Singapore
- 5) Hydroxylamine hydrochloride, analytical grade, Fluka, USA
- 6) *N*-(β -ketocaproyl)-homoserine lactone (3-oxo-C6-AHL), HPLC grade, Sigma-Aldrich, Germany
- 7) Trifluoroacetic acid, HPLC grade, Sigma-Aldrich, USA
- 8) Acetonitrile, HPLC grade, Merck, Germany
- 9) Methanol, HPLC grade, Merck, Germany
- 10) Ethanol, analytical grade, Ajax Finechem, USA
- 11) 37% Hydrochloric acid, analytical grade, Reidel-de Haen, Germany
- 12) 7% perchloric acid, analytical grade, Reidel-de Haen, Germany
- 13) Glycerol, analytical grade, Fluka, USA

อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 1) Plate count agar (PCA), Difco, France
- 2) Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar (TCBS), Merck, Germany
- 3) Nutrient agar (NA), Himedia, India
- 4) Nutrient broth (NB), Himedia, India

- 5) Peptone Bacteriological, Himedia, India
- 6) Xylose lysine deoxycholate agar, Merck, Germany
- 7) Mannitol Salt Agar, Merck, Germany

สายพันธุ์จุลินทรีย์

- 1) *Vibrio parahaemolyticus* DMST 22092 (แยกได้จากอาหารทะเล)
(กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)
- 2) *Vibrio parahaemolyticus* DMST 22093 (แยกได้จากอาหารทะเล)
(กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)
- 3) *Vibrio vulnificus* ATCC 27562 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)
- 4) *Vibrio cholerae* DMST 2873 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)
- 5) *Salmonella* sp. ATCC 13311 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, สถาบันวิจัย
วิทยาศาสตร์สาธารณสุข, ประเทศไทย)
- 6) *Staphylococcus aureus* DMST 65388 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.1 ประเมินสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับ AHL สำหรับพัฒนาเป็นวิธีทาง colorimetry

ประเมินชนิดของสารที่สามารถทำปฏิกิริยาเคมีกับสาร AHL แล้วให้ผลิตภัณฑ์เป็นสารสีที่มีสีเด่นชัดและเสถียร ในการทดลองนี้ใช้สาร AHL มาตรฐาน *N*-(β -ketocaproyl)-L-homoserine lactone (3-oxo-C6-HSL, Sigma-Aldrich, USA) สำหรับเป็นตัวแทนของการทำปฏิกิริยาระหว่างสารในกลุ่ม AHL กับสารที่ใช้ในการทำให้เกิดสารประกอบสี แบ่งเป็นการทดลองย่อยได้ดังนี้

3.1.1 การทำปฏิกิริยาระหว่าง Ferric chloride กับ AHL ที่เสนอโดย Yang และคณะ (2006) และดัดแปลงและพัฒนาต่อโดย รัชติดา เดชอุดม (2550)

เตรียมสารละลาย AHL มาตรฐาน (standard stock solution) 0.005 โมลาร์ (ภาคผนวก ก.1) จากนั้นเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ให้ได้ความเข้มข้น 600 นาโนโมลต่อมิลลิลิตร เพื่อนำมาทดสอบปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน ferric

(III)-hydroxamate โดยนำสารละลาย AHL มาตรฐาน ความเข้มข้น 600 นาโนโมลต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 800 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยากับ reagent I 1000 ไมโครลิตร และ reagent II 1000 ไมโครลิตร ตามลำดับ (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก.2) ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำสารประกอบสีที่เกิดขึ้นไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (Lambda 25 UV/VIS spectrometer, PerkinElmer, USA) ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นปราศจากไอออนทำปฏิกิริยากับ reagent ทั้งสองเป็น blank ทำการทดลองอย่างละ 3 ซ้ำ

โดยที่ reagent I คือ ส่วนผสมของ hydroxylamine hydrochloride 2 โมลาร์ กับ sodium hydroxide 3.5 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1:1 และ reagent II คือ ส่วนผสมของ ferric chloride 10 เปอร์เซ็นต์ ใน hydrochloric 4 โมลาร์ กับ ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:1

ตรวจสอบความเสถียรของสารประกอบเชิงซ้อนสีที่เกิดขึ้น โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบสีต่างๆ 10 นาที เป็นเวลา 30 นาที

3.1.2 การทำปฏิกิริยาระหว่าง Ammonium ferric sulphate กับ AHL ดัดแปร จากวิธีที่พัฒนาโดย รัชิตา เดชอุดม (2550)

วิเคราะห์เช่นเดียวกับการทดลอง 3.1.1 แต่เปลี่ยนสารที่ทำให้เกิดสีจาก ferric chloride เป็น ammonium ferric sulphate

ตรวจสอบความเสถียรของสารประกอบเชิงซ้อนสีที่เกิดขึ้น โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบสีต่างๆ 10 นาที เป็นเวลา 30 นาที

3.1.3 การทำปฏิกิริยาระหว่าง Ammonium ferric sulphate กับ AHL ดัดแปร จากวิธีที่พัฒนาโดย Leitao และ Esteves da Silva (2008)

ปิเปตสารละลาย AHL มาตรฐาน ความเข้มข้น 600 นาโนโมลต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 5 มิลลิลิตร เติม hydroxylamine reagent 0.6 มิลลิลิตร เขย่าแล้วเติม ferric reagent 0.2 มิลลิลิตร เขย่าแล้วเติมสารละลายกรดเปอร์คลอริก 7 เปอร์เซ็นต์ 0.3 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก.3) เขย่าแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำสารประกอบสีที่เกิดขึ้นไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (Lambda 25 UV/VIS spectrometer, PerkinElmer, USA) ที่ความยาวคลื่น 512 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นปราศจากไอออนทำปฏิกิริยากับ reagent เป็น blank ทำการทดลองอย่างละ 3 ซ้ำ

โดยที่ Hydroxylamine reagent คือ ส่วนผสมของ hydroxylamine hydrochloride 9.375 เปอร์เซ็นต์ กับสารละลาย sodium hydroxide 18.750 เปอร์เซ็นต์ ใน

อัตราส่วน 1:1 และ Ferric reagent คือ สารละลาย ammonium ferric sulphate 2 เปอร์เซ็นต์ ใน สารละลายกรดเปอร์คลอริก 7 เปอร์เซ็นต์

ตรวจสอบความเสถียรของสารประกอบเชิงซ้อนสีที่เกิดขึ้น โดยวัดค่าการ ดูดกลืนแสงของสารประกอบสีต่างๆ 10 นาที เป็นเวลา 30 นาที

3.1.4 การทำปฏิกิริยาระหว่าง Ferric chloride กับ AHL ดัดแปรจากวิธีที่พัฒนา โดย Leitao และ Esteves da Silva (2008)

วิเคราะห์เช่นเดียวกับการทดลอง 3.1.3 แต่เปลี่ยนสารที่ทำให้เกิดสีจาก ammonium ferric sulphate เป็น ferric chloride

ตรวจสอบความเสถียรของสารประกอบเชิงซ้อนสีที่เกิดขึ้น โดยวัดค่าการ ดูดกลืนแสงของสารประกอบสีต่างๆ 10 นาที เป็นเวลา 30 นาที

คัดเลือกปฏิกิริยาที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการตรวจวัดสาร AHL ในการทดลองต่อไป โดยพิจารณาจากปฏิกิริยาที่ให้สารประกอบสีที่เด่นชัดและมีความเสถียร เพื่อนำไปพัฒนาเป็นวิธี colorimetry สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

3.2 พิสูจน์การสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus* ด้วย HPLC

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการตรวจสอบมีทั้งหมด 3 สายพันธุ์ คือ *V. parahaemolyticus* DMST 22092 และ *V. parahaemolyticus* DMST 22093 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สร้างสารควอรัมเซนซิงในกลุ่ม AHL และใช้ *Salmonella* sp. ATCC 13311 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่สร้างสารในกลุ่ม AHL เป็น ตัวอย่างควบคุมลบ (AHL negative strains) เตรียมสารชะโคโลนีของจุลินทรีย์โดยเฉพาะเลี้ยง *V. parahaemolyticus* DMST 22092 และ *V. parahaemolyticus* DMST 22093 ในอาหาร nutrient broth (NB) ที่มีเกลือร้อยละ 3 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรเพาะเลี้ยง *Salmonella* sp. ATCC 13311 ในอาหาร NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้อง ให้อากาศแบบ orbital shaking ที่ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อ (sterile cotton swab) จุ่มลงในคัลเจอร์แล้วป้าย (swab) ลงบนอาหาร nutrient agar (NA) ที่มีเกลือร้อยละ 3 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อโคโลนีที่เจริญบนผิวหน้าอาหารจำนวน 2 ลูบ กระจายลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงทันทีที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที กรองส่วนใส (supernatant) ที่ได้ด้วย membrane

filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เพื่อแยกเซลล์จุลินทรีย์และสารเจือปนอื่นๆออก เก็บรักษาสารชะโคโลนีของจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ระหว่างรอการนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

การวิเคราะห์สาร AHL ในสารชะโคโลนีด้วย HPLC มีสภาวะดังนี้ คอลัมน์ที่ใช้ในการทดลองคือ Luna C₁₈ II column, 100A 150 x 4.6 mm (Phenomenex), Ultraviolet-Visible detector ; Waters 2487 Dual Absorbance เฟสเคลื่อนที่คือ water-CH₃CN gradient system (แสดงดังตารางที่ 3.1) ปริมาณสารตัวอย่างที่ฉีด (injection volume) คือ 10 ไมโครลิตร อัตราการไหล (flow rate) เท่ากับ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิที่ใช้ในการวิเคราะห์ 25 องศาเซลเซียส (รัชธิดา เดชอุดม, 2550) ทำการทดลองอย่างละ 2 ซ้ำ

ในการวิเคราะห์นี้ใช้สาร *N*-(β-ketocaproyl)-homoserine lactone (3-oxo-C6-HSL) (Sigma-Aldrich, Germany) เป็นสารมาตรฐาน เตรียมโดยละลายสาร AHL มาตรฐาน 0.6 มิลลิกรัม ลงในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

ตารางที่ 3.1 เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในการวิเคราะห์สาร AHL ด้วย HPLC

เฟสเคลื่อนที่ (acetonitrile : water) (v/v)	เวลา (นาที)
5 : 95	0
35 : 65	15
100 : 0	20
100 : 0	25
5 : 95	30

3.3 ประเมินการตรวจสอบสาร AHL ที่สร้างจาก *V. parahaemolyticus* ด้วยวิธี colorimetry

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการตรวจสอบการสร้าง AHL ด้วยวิธี colorimetry คือ จุลินทรีย์ที่ผ่านการตรวจสอบการสร้าง AHL ด้วยวิธี HPLC จากข้อ 3.2

เพาะเลี้ยง *V. parahaemolyticus* ในอาหาร NB ที่มีเกลือร้อยละ 3 และเพาะเลี้ยง *Salmonella* sp. ใน NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้อง ให้อากาศแบบ orbital shaking ที่ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ประมาณ 9logCFU/ml จากนั้นปีเปตคัลเจอร์ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด eppendorf นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm

อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเซลล์ออก นำส่วนใสที่ได้ไปตรวจสอบ AHL ด้วยวิธี colorimetry ที่เลือกจากข้อ 3.1 จากนั้นตรวจสอบความยาวคลื่นที่ทำให้เกิดการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ด้วย spectrophotometer (Lambda 25 UV/VIS spectrometer, PerkinElmer, USA)

สารมาตรฐานที่ใช้ในการทดลองคือ *N*-(β -ketocaproyl)-homoserine lactone (3-oxo-C6-AHL) (Sigma - Aldrich, Germany) โดยเตรียมในรูปแบบของสารละลายในน้ำกลั่นและละลายในอาหาร NB แล้วนำไปทำปฏิกิริยาและตรวจสอบค่า λ_{max} ด้วยวิธี colorimetry ในรูปแบบเดียวกับที่กล่าวข้างต้น

3.4 ศึกษาสมบัติการสร้างสาร AHL ของ *V. parahaemolyticus* ภายใต้สภาวะที่มีเกลือด้วยวิธี colorimetry

3.4.1 ประเมินความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus*

นำคัลเจอร์ของ *V. parahaemolyticus* DMST 22093 ที่เพาะเลี้ยงใน NB ที่มีเกลือร้อยละ 3 ภายใต้อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง มาทำเจือจางให้ได้จำนวนเซลล์ประมาณ $6\log\text{CFU/ml}$ แล้วปิเปตคัลเจอร์ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน peptone water (ร้อยละ 1) ที่มีเกลือร้อยละ 0, 3, 6, 8 และ 10 ตามลำดับ ปริมาตร 99 มิลลิลิตร (ได้จำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ $4\log\text{CFU/ml}$) เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้อง และให้อากาศแบบ orbital shaking ที่ 200 rpm ติดตามการเจริญและการสร้าง AHL เป็นเวลา 12, 18 และ 24 ชั่วโมง การเจริญติดตามโดยการตรวจสอบจำนวนประชากรที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ spread plate ลงบนอาหาร NA ที่มีเกลือร้อยละ 3 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบปริมาณ AHL ที่สร้างจากเชื้อโดยการปิเปตคัลเจอร์ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด eppendorf ที่เวลา 12, 18 และ 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใสที่ได้ไปตรวจสอบ AHL ด้วยวิธี colorimetry ที่ประเมินได้จากข้อ 3.3 ทำการทดลองอย่างละ 2 ซ้ำ

3.4.2 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์กับอัตราการเจริญและการสร้าง AHL ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเกลือที่เหมาะสม

นำคัลเจอร์ของ *V. parahaemolyticus* DMST 22093 ที่เพาะเลี้ยงใน NB ที่มีเกลือร้อยละ 3 ภายใต้อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง มาทำเจือจางให้ได้จำนวนเซลล์ประมาณ

6logCFU/ml และ 4logCFU/ml แล้วบีบเปิดคัลเจอร์ที่เจือจางแล้วที่แต่ละระดับเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน peptone water (ร้อยละ 1) ที่มีความเข้มข้นเกลือที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.1 ปริมาตร 99 มิลลิลิตร (เพื่อให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น 4 logCFU/ml และ 2 logCFU/ml ตามลำดับ) ติดตามอัตราการเจริญและอัตราการสร้าง AHL ด้วยวิธีเดียวกับข้อ 3.4.1 โดยชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 4 จะติดตามทุกๆครึ่งชั่วโมง หลังจากนั้นจะติดตามทุกๆ 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ทำการทดลองอย่างละ 2 ซ้ำ

ประเมินอัตราการเจริญในค่า specific growth rate (μ) ดังสมการ (1) และ ประเมินความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการเพาะเลี้ยง จำนวนเซลล์ และปริมาณ AHL โดยใช้สมการทางคณิตศาสตร์ ดังนี้

$$\mu = \frac{\log N_t - \log N_0}{0.301 \times t} \quad (1)$$

N_0 เป็นจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น

N_t เป็นจำนวนแบคทีเรียเมื่อทำการแบ่งตัวเป็นเวลา

t เป็นเวลาทั้งหมดที่ใช้ในการเจริญ

คัดเลือกสภาวะเกลือที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus* เพื่อใช้เป็นสภาวะในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียดังกล่าวในการทดลองต่อไป โดยพิจารณาจากอัตราการเจริญและปริมาณ AHL ที่สร้าง

3.4.3 ศึกษาการเจริญและการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus* ในระบบการเพาะเลี้ยงที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นแตกต่างกัน

เพาะเลี้ยง *V. parahaemolyticus* DMST 22093 ใน peptone water (ร้อยละ 1) ภายใต้สภาวะเกลือที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.2 โดยแปรจำนวนเซลล์เริ่มต้น 1log, 2log, 3log, 4log, 5log, 6log, 7log และ 8log CFU/ml ที่สภาวะอุณหภูมิห้อง และให้อากาศแบบ orbital shaking ที่ 200 rpm ติดตามการเจริญและการสร้าง AHL ด้วยวิธีเดียวกับข้อ 3.4.1 โดยเริ่มตรวจสอบในชั่วโมงที่คัลเจอร์มีความขุ่นที่สามารถสังเกตได้ หลังจากนั้นตรวจสอบทุกๆ 2 ชั่วโมง จนกระทั่งค่า AHL (OD_{520}) ที่ตรวจวัดได้มีค่าประมาณ 0.1 (OD_{520}) ซึ่งเวลาที่เชื้อใช้ในการเจริญจนมีจำนวนเซลล์มากถึงระดับที่สร้าง AHL ถึง 0.1 จะเรียกว่า detection time (DT) ทำการทดลองอย่างละ 2 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์เริ่มต้นกับค่า DT ในรูปของสมการทางคณิตศาสตร์ สำหรับใช้ในการทำนายจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ในระบบอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.5 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus*

ประเมินปัจจัยที่อาจมีอิทธิพลต่อรูปแบบการเจริญและการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus* และอาจส่งผลให้ค่า DT ของระบบการตรวจวัดที่ประเมินได้ในข้อ 3.4.3 มีความแปรผัน โดยศึกษาปัจจัยดังต่อไปนี้

3.5.1 อันตรกิริยากับจุลินทรีย์ชนิดอื่น

เพาะเลี้ยง *V. parahaemolyticus* ในอาหาร peptone water (ร้อยละ 1) ภายใต้สภาวะเกลือที่เลือกจากข้อ 3.4.2 ร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่น โดยให้แบคทีเรียทุกชนิดมีจำนวนเซลล์เริ่มต้น $4 \log \text{CFU/ml}$ ดังแสดงในตารางที่ 3.2 เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้อง และให้อากาศที่ 200 rpm ตรวจสอบการเจริญและการสร้าง AHL ในชั่วโมงที่คัลเจอร์มีความขุ่นที่สังเกตได้ และหลังจากนั้นตรวจสอบทุกๆ 2 ชั่วโมง จนกระทั่งค่า AHL ที่ตรวจวัดได้มีค่าประมาณ 0.1 (OD_{520}) เพื่อประเมินหาค่า DT ของแต่ละระบบการเพาะเลี้ยง ตรวจสอบจำนวนประชากรของเชื้อแต่ละชนิดโดยการนำคัลเจอร์ไป spread ลงบนอาหารที่จำเพาะกับเชื้อชนิดต่างๆ ได้แก่ Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar (TCBS) เพื่อตรวจสอบ *V. parahaemolyticus*, Xylose lysine deoxycholate agar (XLD) เพื่อตรวจสอบ *Salmonella* sp. และ Mannitol Salt Agar (MSA) ตรวจสอบ *Staphylococcus aureus* ทำการทดลองอย่างละ 2 ซ้ำ

ตารางที่ 3.2 สายพันธุ์ของแบคทีเรีย และอัตราส่วนของจำนวนเซลล์ชนิดต่างๆที่ใช้ในการทดลอง

สายพันธุ์แบคทีเรีย	อัตราส่วนจำนวนเซลล์เริ่มต้น ($\log \text{CFU/ml}$)
<i>V. parahaemolyticus</i> DMST22093	4
<i>V. parahaemolyticus</i> DMST22093 + <i>Salmonella</i> sp. ATCC13311	4:4
<i>V. parahaemolyticus</i> DMST22093 + <i>S. aureus</i> DMST 65388	4:4
<i>V. parahaemolyticus</i> DMST22093 + <i>V. vulnificus</i> ATCC 27562	4:4
<i>V. parahaemolyticus</i> DMST22093 + <i>Salmonella</i> sp. ATCC 13311+	4:4:4:4
<i>S. aureus</i> DMST 65388+ <i>V. vulnificus</i> ATCC 27562	

3.5.2 การทำให้ *V. parahaemolyticus* สัมผัสกับอุณหภูมิแช่เย็นหรือแช่เยือกแข็งก่อนการเพาะเลี้ยง

นำคัลเจอร์ของ *V. parahaemolyticus* DMST 22093 ที่เพาะเลี้ยงใน NB เป็นเวลา 12 ชั่วโมง มาทำเจือจางให้ได้จำนวนเซลล์ประมาณ $8\log\text{CFU/ml}$ ปิเปตคัลเจอร์ 5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ จนคัลเจอร์มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง จึงปิเปตคัลเจอร์ที่ได้ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน peptone water (ร้อยละ 1) 99 มิลลิลิตร ที่มีเกลือความเข้มข้นที่คัดเลือกจากข้อ 3.4.2 (ได้จำนวนเซลล์เริ่มต้น $6\log\text{CFU/ml}$) เพาะเลี้ยงและติดตามการเจริญและการสร้าง AHL เช่นเดียวกับข้อ 3.4.3 ทำการทดลองอย่างละ 2 ซ้ำ

3.5.3 อิทธิพลจากองค์ประกอบของอาหารทะเล

นำตัวอย่างปลาหมึกสด 25 กรัม ใส่ลงในถุงพลาสติกปิดสนิทที่มี peptone water (ร้อยละ 1) 225 มิลลิลิตร นำไปตีด้วยเครื่อง stomacher ที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 2 นาที ปิเปตน้ำปลาหมึกที่ได้จากการตีปั่น 10 มิลลิลิตร ใส่ลงใน peptone water (ภาวะเหมือนข้อ 3.4.3) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เตรียมตัวอย่างน้ำปลาหมึกเป็น 2 ชุด เพื่อนำไปทดสอบดังต่อไปนี้

- ชุดแรก เติมสาร AHL มาตรฐาน (3-oxo-C6-HSL) ความเข้มข้น 600 nmol/ml ลงไป แล้วนำไปตรวจวัดปริมาณ AHL ด้วยวิธี colorimetry เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมคือ สารละลาย AHL มาตรฐานใน peptone water ที่ความเข้มข้นเดียวกัน

- ชุดที่สอง เติมเซลล์ *V. parahaemolyticus* โดยให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น $3\log\text{CFU/ml}$ ตรวจสอบการเจริญและการสร้าง AHL เช่นเดียวกับข้อ 3.4.3 เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม คือระบบที่เพาะเลี้ยง *V. parahaemolyticus* ใน peptone water ที่ไม่ผสมน้ำปลาหมึก

ทุกการทดลองทำการทดสอบ 2 ซ้ำ

3.6 การประมาณจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ด้วยการติดตามค่า DT เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน MPN

3.6.1 ประเมินการตรวจสอบในระบบเชื้อบริสุทธิ์

นำคัลเจอร์ของ *V. parahaemolyticus* ในอาหาร NB ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง มาทำเจือจางแล้วเติมลงใน peptone water (ร้อยละ 1) ที่มีเกลือความเข้มข้นที่คัดเลือกจากข้อ 3.4.2 ปริมาตร 99 มิลลิลิตร โดยแปรจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น $6\log$, $5\log$, $4\log$, $3\log$,

2log และ 1log CFU/ml ตรวจสอบการเจริญและการสร้าง AHL โดยการติดตามค่า DT เช่นเดียวกับข้อ 3.4.3 และส่งคัลเจอร์ชุดเดียวกันไปวิเคราะห์ค่า Most Probable Number (MPN) (ภาคผนวก ข.1) ที่ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยควบคุมเวลาเริ่มต้นการทดสอบให้เป็นเวลาเดียวกัน

3.6.2 ประเมินการตรวจสอบในระบบอาหารทะเลสด

อาหารทะเลสดที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.3 ตรวจสอบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างด้วยวิธี colorimetry ที่พัฒนาได้ควบคุมกับวิธีมาตรฐาน MPN โดยส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยควบคุมเวลาเริ่มต้นการทดสอบเป็นเวลาเดียวกัน

ซึ่งตัวอย่างอาหารทะเล 25 กรัม ใส่ลงใน peptone water (ร้อยละ 1) 225 มิลลิลิตร ตีตัวอย่างด้วยเครื่อง stomacher ที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 2 นาที ดูน้ำที่ได้จากการตี ปั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงใน peptone water (ภาวะเหมือนข้อ 3.4.3) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้อง และให้อากาศที่ 200 rpm ตรวจสอบจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยการ spread คัลเจอร์ลงบนอาหาร plate count agar (PCA) และตรวจสอบจำนวนจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Vibrio* ด้วยการ spread คัลเจอร์ลงบนอาหาร TCBS พร้อมทั้งตรวจสอบปริมาณ AHL จากคัลเจอร์ที่แยกเซลล์ออกแล้ว (cell-free supernatant) ด้วยวิธี colorimetry เพื่อหาค่า DT ทำการทดลองตัวอย่างละ 2 ซ้ำ

ตารางที่ 3.3 ชนิดและแหล่งที่มาของอาหารทะเลที่ใช้ในการทดลอง

ชนิดของอาหารทะเล	แหล่งที่มา
1.ปลาหมึกสด+ <i>V. parahaemolyticus</i> จำนวนเซลล์ 2logCFU/ml (วิธีเติมเชื้อแสดงใต้ตาราง)	ทะเลใกล้ ไลต์ส
2.กุ้งสด+ <i>V. parahaemolyticus</i> จำนวนเซลล์ 6logCFU/ml (วิธีเติมเชื้อแสดงใต้ตาราง)	ทะเลใกล้ ไลต์ส
3.กุ้งสด	ทะเลใกล้ ไลต์ส
4.ปลาหมึกสด	ทะเลใกล้ ไลต์ส
5.หอยนางรม	ทะเลใกล้ ไลต์ส
6.กุ้งดิบปอกเปลือกแช่แข็งรับซื้อจาก supplier รอเข้ากระบวนการผลิต และไม่ต้องผ่านการล้างด้วยคลอรีน	บริษัท ไทยเดลมาร์ จำกัด
7.กุ้งดิบที่ถูกล้างด้วยคลอรีน 50-100 ppm ปอกเปลือก แล้วนำมาผสมแป้งและเครื่องปรุง อัดขึ้นรูปเป็นแผ่น	บริษัท ไทยเดลมาร์ จำกัด
8.กุ้งดิบทั้งตัวที่ถูกล้างด้วยคลอรีน 50-100 ppm	บริษัท ไทยเดลมาร์ จำกัด
9.กุ้งดิบทั้งตัวที่ถูกล้างด้วยคลอรีน 50-100 ppm แล้วนำมาปอกเปลือก	บริษัท ไทยเดลมาร์ จำกัด
10.กุ้งดิบที่ถูกล้างด้วยคลอรีน 50-100 ppm ปอกเปลือก นำมาผสมแป้งและเครื่องปรุง อัดขึ้นรูปเป็นแผ่น แช่แข็ง -18 °C	บริษัท ไทยเดลมาร์ จำกัด
11.กุ้งดิบที่ถูกล้างด้วยคลอรีน 50-100 ppm ปอกเปลือก นำมาผสมแป้งและเครื่องปรุง อัดขึ้นรูปเป็นแผ่น แช่แข็ง -18 °C	บริษัท ไทยเดลมาร์ จำกัด
12.กุ้งดิบที่ถูกล้างด้วยคลอรีน 50-100 ppm ปอกเปลือก นำมาผสมแป้งและเครื่องปรุง อัดขึ้นรูปเป็นแผ่น แช่แข็ง -18 °C ชุบแป้งและเกล็ดขนมปัง แล้วแช่แข็ง -18 °C อีกครั้ง	บริษัท ไทยเดลมาร์ จำกัด
13.กุ้งดิบที่ถูกล้างด้วยคลอรีน 50-100 ppm ปอกเปลือก นำมาผสมแป้งและเครื่องปรุง อัดขึ้นรูปเป็นแผ่น แช่แข็ง -18 °C ชุบแป้งและเกล็ดขนมปัง แล้วแช่แข็ง -18 °C อีกครั้ง	บริษัท ไทยเดลมาร์ จำกัด
14.กุ้งดิบทั้งตัวที่ถูกล้างด้วยคลอรีน 50-100 ppm	บริษัท ไทยเดลมาร์ จำกัด

เติมเซลล์เจอร์ของ *V. parahaemolyticus* ที่มีจำนวนเซลล์ 8log และ 4log CFU/ml อย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างปลาหมึกสด และกุ้งสด ที่ผ่านการ decontamination ด้วยคลอรีนและน้ำกลั่นปลอดเชื้อ แล้วผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ข้างต้น เพื่อให้ได้จำนวนเซลล์เริ่มต้นในปลาหมึกและกุ้งสดเป็น 2log และ 6log CFU/ml ตามลำดับ

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ประเมินสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับ AHL สำหรับพัฒนาเป็นวิธีทาง colorimetry

เนื่องจากโครงสร้างของสาร Acyl homoserine lactone หรือ AHL นั้นมีวงแหวนแลกโทนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งวงแหวนนี้เมื่ออยู่ในภาวะที่เป็นเบสจะแตกกลายเป็นเอสเตอ์สายตรงที่สามารถทำปฏิกิริยากับสารละลาย hydroxylamine แล้วเกิดเป็นสารประกอบ hydroxamic acid ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาต่อกับสารที่เป็นไอออนของเหล็ก เช่น ferric chloride เกิดสารประกอบเชิงซ้อน Ferric(III)-hydroxamate ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสี และตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่อง spectrophotometer ได้ (Yang และคณะ, 2006) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงประเมินหาสารในกลุ่มไอออนของเหล็กสำหรับใช้ในการทำปฏิกิริยากับ AHL เพื่อให้เกิดเป็นสารประกอบสี สำหรับพัฒนาเป็นวิธีการตรวจสอบแบบ colorimetry เพื่อประยุกต์ใช้เป็นวิธีตรวจสอบ AHL ที่สร้างจาก *V. parahaemolyticus* ต่อไป โดยแบ่งเป็น 3 การทดลองย่อย ดังแสดงในข้อ 3.1 ได้ผลการทดลองดังนี้

4.1.1 การทำปฏิกิริยาระหว่าง Ferric chloride กับ AHL ที่เสนอโดย Yang และคณะ (2006) และดัดแปลงและพัฒนาต่อโดย รัชติดา เดชอุดม (2550)

เมื่อนำสารมาตรฐาน AHL ที่ละลายในน้ำกลั่น ความเข้มข้น 600 นาโนโมลต่อมิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับ reagent I และ reagent II ตามวิธีของรัชติดา เดชอุดม (2550) พบว่าเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำตาล เมื่อตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ที่เวลา 0 นาที พบว่าให้ค่า OD_{520} เท่ากับ 0.207 ± 0.002 จากนั้นตรวจสอบค่า OD_{520} ทุกๆ 10 นาที เป็นเวลา 30 นาที เพื่อตรวจสอบความเสถียรของสารประกอบสีที่เกิดขึ้น ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.1 พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป ค่า OD_{520} ที่ตรวจวัดได้ในนาทีที่ 10 และ 20 มีแนวโน้มลดลงแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่เมื่อตรวจวัดที่นาทีที่ 30 พบว่าค่า OD_{520} ที่ตรวจวัดได้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แสดงให้เห็นว่าสารประกอบเชิงซ้อนสีที่เกิดขึ้นนั้นมีความเสถียรในช่วงเวลา 20 นาที ดังนั้นการตรวจสอบสารประกอบสีที่เกิดจากปฏิกิริยานี้ควรตรวจวัดภายในเวลาไม่เกิน 20 นาที

ตารางที่ 4.1 ค่า OD₅₂₀ ที่ระยะเวลาต่างๆ จากการวิเคราะห์ด้วยการทดลอง 4.1.1

ระยะเวลา (นาที)	OD ₅₂₀ ^E
0	0.207 ^a ± 0.002
10	0.203 ^a ± 0.004
20	0.198 ^a ± 0.003
30	0.182 ^b ± 0.008

^E ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของการทดลอง 3 ซ้ำ

^{a,b} ค่าที่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.1.2 การทำปฏิกิริยาระหว่าง Ammonium ferric sulphate กับ AHL ดัดแปรจากวิธีที่พัฒนาโดย รัชชิตา (2550)

Ammonium ferric sulphate เป็น coloring agent ชนิดหนึ่งที่มีรายงานว่าสามารถทำปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน ferric-hydroxamate แล้วให้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีแดง (Leitao และ Esteves da Silva, 2008) ซึ่งแตกต่างจากสีของ reagent ทำให้มองเห็นด้วยตาเปล่าชัดเจน ดังนั้นจึงทดลองนำมาใช้เป็นไอออนของเหล็กแทน ferric chloride ดัดแปรตามวิธีของรัชชิตา เดชอุดม (2550) จากผลการทดลองพบว่า เมื่อนำสารมาตรฐาน AHL ที่ละลายในน้ำกลั่น ความเข้มข้น 600 นาโนโมลต่อมิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับ reagent I และ reagent II ตามลำดับ จะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำตาลเช่นเดียวกับปฏิกิริยาของ FeCl₃ เมื่อตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ที่เวลา 0 นาที พบว่าให้ค่า OD₅₂₀ เท่ากับ 0.203±0.006 จากนั้นตรวจสอบค่า OD₅₂₀ ทุกๆ 10 นาที เป็นเวลา 30 นาที เพื่อตรวจสอบความเสถียรของสารประกอบสีที่เกิดขึ้น ได้ผลการทดลองคล้ายกับปฏิกิริยาของ FeCl₃ (ตารางที่ 4.2) โดยพบว่า เมื่อเวลาผ่านไป ค่า OD₅₂₀ ที่ตรวจวัดได้ในนาทีที่ 10 และ 20 มีแนวโน้มลดลงแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่เมื่อตรวจวัดที่นาทีที่ 30 พบว่าค่า OD₅₂₀ ที่ตรวจวัดได้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แสดงให้เห็นว่าสารประกอบเชิงซ้อนสีที่เกิดขึ้นนั้นมีความเสถียรในช่วงเวลา 20 นาที ดังนั้นการตรวจสอบสารประกอบสีที่เกิดจากปฏิกิริยานี้ควรตรวจวัดภายในเวลาไม่เกิน 20 นาที เช่นเดียวกับปฏิกิริยาในข้อ 4.1.1 ถึงแม้ว่าจะให้ผลใกล้เคียงกับปฏิกิริยาของ FeCl₃ แต่พบว่า วิธีนี้มีความยุ่งยากในขั้นตอนการเตรียมสารเคมีเนื่องจาก ammonium ferric sulphate ละลายใน methanol 50% ได้ค่อนข้างยาก ต้องใช้เวลานานในการเตรียมสารประมาณ 2 วัน

ตารางที่ 4.2 ค่า OD₅₂₀ ที่ระยะเวลาต่างๆ จากการวิเคราะห์ด้วยการทดลอง 4.1.2

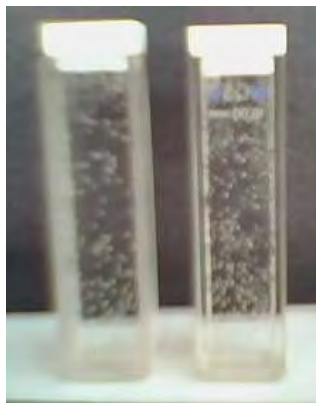
ระยะเวลา (นาที)	OD ₅₂₀ ^E
0	0.203 ^a ± 0.006
10	0.197 ^a ± 0.006
20	0.189 ^{ab} ± 0.001
30	0.178 ^b ± 0.001

^E ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของการทดลอง 3 ซ้ำ

^{a,b} ค่าที่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.1.3 การทำปฏิกิริยาระหว่าง Ammonium ferric sulphate กับ AHL ดัดแปรจากวิธีที่พัฒนาโดย Leitao และ Esteves da Silva (2008)

Leitao และ Esteves da Silva (2008) พัฒนาวิธีการตรวจสอบสาร Diltiazem ด้วยปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน ferric-hydroxamate โดยใช้ Ammonium ferric sulphate เป็น coloring agent พบว่าให้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีแดง ที่สามารถตรวจวัดด้วย spectrophotometer ได้ และเนื่องจากโครงสร้างของสาร Diltiazem มีความคล้ายคลึงกับสาร AHL ในส่วนของวงแหวนแลกโทน ดังนั้นจึงทดลองนำปฏิกิริยาที่คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษามาทดลองใช้ในการตรวจสอบสาร AHL โดยเมื่อนำสาร AHL มาตรฐานละลายในน้ำกลั่น ความเข้มข้น 600 นาโนโมลต่อมิลลิลิตร ไปทำปฏิกิริยาตามการทดลอง 3.1.3 แล้ว พบว่าเกิดสารประกอบสีน้ำตาลแดงเกิดขึ้น แต่ในสารละลายมีฟองอากาศเป็นจำนวนมาก (รูปที่ 4.1) จึงไม่สามารถตรวจวัดสมบัติการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ได้ และเมื่อกำจัดฟองที่เกิดขึ้นด้วย sonication bath มีผลให้สีของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นลดลง ทำให้ไม่สามารถใช้ปฏิกิริยานี้ในการตรวจวัด AHL ได้ นอกจากนี้การเตรียมสารละลายของ ammonium ferric sulphate ใน perchloric acid 70% ต้องใช้ระยะเวลานาน 1 วัน



รูปที่ 4.1 ลักษณะฟองอากาศที่เกิดขึ้นหลังจากเกิดปฏิกิริยาตามการทดลอง 4.1.3

4.1.4 การทำปฏิกิริยาระหว่าง Ferric chloride กับ AHL ดัดแปรจากวิธีที่พัฒนาโดย Leitao และ Esteves da Silva (2008)

เนื่องจากความยุ่งยากในการเตรียมสารละลาย Ammonium ferric sulphate และในขณะเดียวกันก็พบปัญหาเรื่องฟองอากาศ จึงทดลองใช้การทำปฏิกิริยาของ Leitao และ Esteves da Silva (2008) แต่เปลี่ยนสารที่ใช้ทำปฏิกิริยากับ AHL เป็น ferric chloride เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว พบว่า เมื่อนำ AHL มาตรฐานไปทำปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน ferric hydroxamate ตามการทดลอง 3.1.4 โดยใช้ ferric chloride ซึ่งเป็นไอออนของเหล็กที่จะเข้าไปจับกับสารประกอบ hydroxamic acid ให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำตาล ผลการทดลองพบว่าเกิดปัญหาเช่นเดียวกับผลการทดลองในข้อ 4.1.3 กล่าวคือ มีฟองอากาศเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก (รูปที่ 4.2) ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบสมบัติการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ได้เช่นเดียวกับข้อ 4.1.3



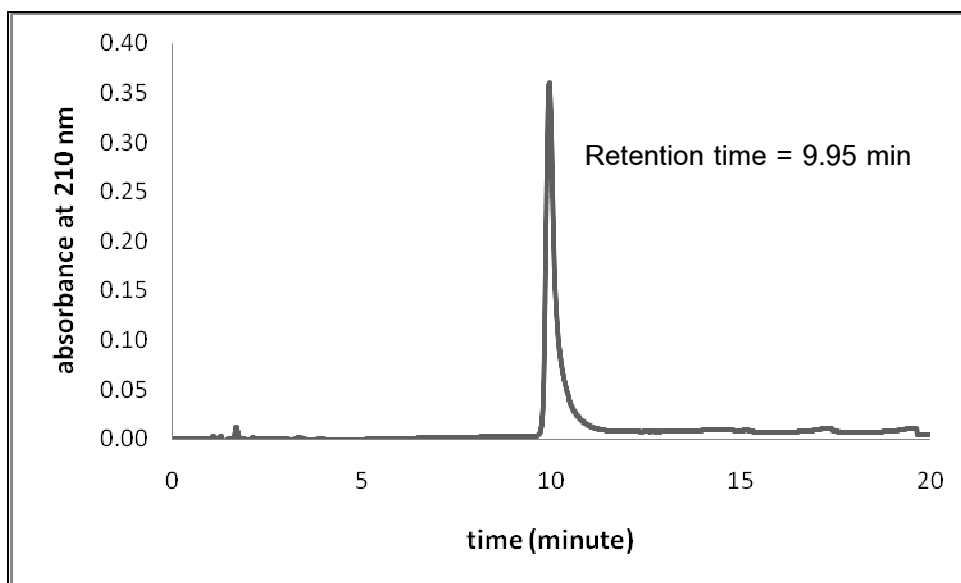
รูปที่ 4.2 ลักษณะฟองอากาศที่เกิดขึ้นหลังจากเกิดปฏิกิริยาตามการทดลอง 4.1.4

จากผลการทดลอง เมื่อประเมินหาภาวะที่เหมาะสมแล้วพบว่า การทดลองในข้อ 4.1.1 ซึ่งเป็นการทำปฏิกิริยาระหว่าง Ferric chloride กับ AHL ที่เสนอโดย Yang และคณะ (2006) และดัดแปลงและพัฒนาต่อโดย รัชชิตา เดชอุดม (2550) เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากเป็นวิธีที่ให้ผลิตภัณฑ์สารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีค่อนข้างเด่นชัด มีความเสถียรนานถึง 20 นาที ทำให้สามารถวัดค่า OD ได้ภายใน 10-20 นาที และเกิดฟองอากาศน้อย ดังนั้นในการปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาที (ตามขั้นตอนในการทดลอง) ก็สามารถกำจัดฟองอากาศที่เกิดขึ้นให้หมดไปได้ ถึงแม้การใช้ปฏิกิริยาตามวิธีในข้อ 3.1.2 จะให้ผลไม่แตกต่างจากปฏิกิริยาในข้อ 3.1.1 แต่มีข้อด้อย คือความยุ่งยากในการเตรียมสารละลาย ดังนั้นจึงเลือกใช้สาร $FeCl_3$ ในการทำปฏิกิริยากับ AHL ภายใต้สภาวะการทำปฏิกิริยาในข้อ 3.1.1 เพื่อให้เกิดสารประกอบสีสำหรับพัฒนาเป็นวิธีทาง colorimetry ในการทดลองขั้นต่อไป

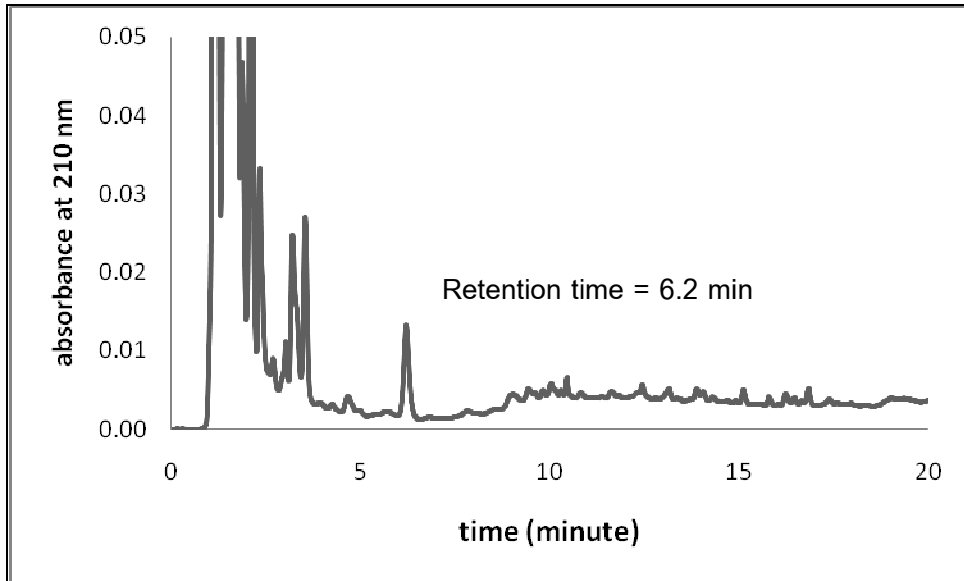
4.2 พิสูจน์การสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus* ด้วย HPLC

ในการทดลองนี้ตรวจสอบเพื่อยืนยันการสร้างสาร AHL ของ *V. parahaemolyticus* ที่ใช้ในการทดลองด้วย HPLC ทั้งนี้เนื่องจากสาร AHL จะถูกสร้างแล้วหลั่งออกมานอกเซลล์ (Podbielski และ Kreikemeyer, 2004) และสารนี้มีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดี ดังนั้นจึงทดลองชะสาร AHL ออกจากโคโลนีของ *V. parahaemolyticus* อายุ 24 ชั่วโมง ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ แล้วปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกตามวิธีของรัชชิตา เดชอุดม (2550) เมื่อได้สารชะโคโลนีแล้วจึงนำไปฉีดวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC โดยใช้สาร 3-oxo-C6-HSL เป็นสารมาตรฐาน และใช้สารสกัดจากโคโลนีของ *Salmonella* sp. ATCC 13311 เป็นตัวอย่างควบคุมลบ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.3 ถึง 4.6 พบว่า โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน 3-oxo-C6-HSL ที่แสดงในรูปที่ 4.3 ปรากฏพีคขึ้นที่เวลา 9.95 นาที ส่วนโครมาโตแกรมของสารสกัดจากโคโลนีของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ DMST 22092 และ DMST 22093 ที่แสดงในรูปที่ 4.4 และ 4.5 นั้น พบว่ามีพีคหลักปรากฏขึ้นหนึ่งพีคที่เวลา 6.2 นาที เหมือนกันทั้งสองสายพันธุ์ ซึ่งพีคดังกล่าวมีแนวโน้มที่น่าจะเป็นสารในกลุ่มเอซิลโฮโมซีรีนแลกโตนที่มีสายโซ่เอซิลที่สั้นกว่า 3-oxo-C6-HSL ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน ทั้งนี้มีรายงานว่า *V. parahaemolyticus* สร้างสัญญาณ AI-1 ชนิด 3-hydroxybutanoyl-homoserine lactone (3-hydroxyl-C4-HSL) เป็นชนิดหลัก (Bassler และคณะ, 1997 และ Henke และ Bassler, 2004) เมื่อพิจารณาจากความยาวของสายโซ่เอซิลแล้ว ก็ จะพบว่า 3-hydroxyl-C4-HSL มีความยาวของสายโซ่เอซิลที่สั้นกว่าสารมาตรฐาน 3-oxo-C6-HSL สารที่มีโมเลกุลสายสั้นกว่าแสดงถึงความมีขี้กว่าจะถูกชะด้วยเฟสเคลื่อนที่ออกมาก่อน ดังนั้นพีคของโครมาโตแกรมในรูปที่ 4.4 และ 4.5 จึงน่าจะเป็นพีคของสาร AHL ที่มีโมเลกุลสายสั้น

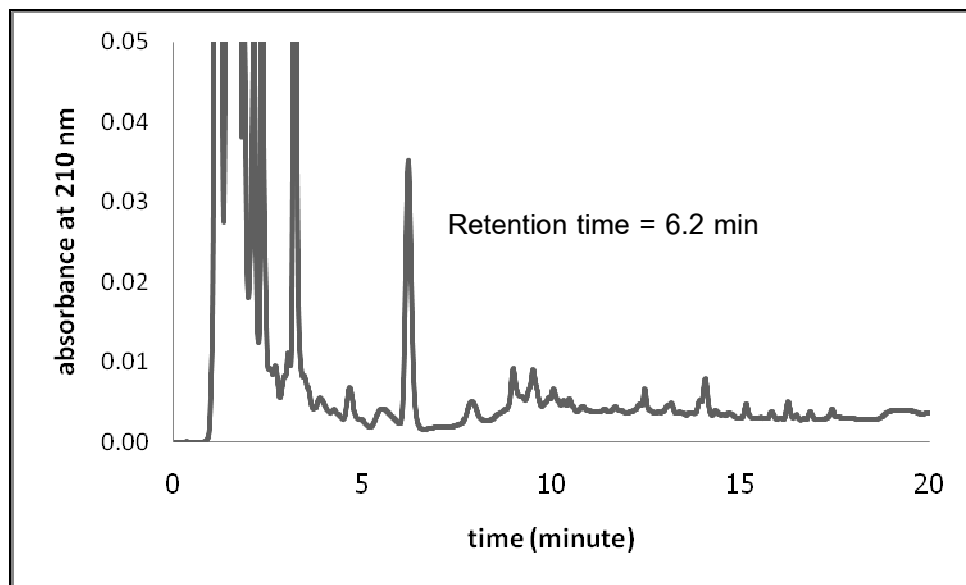
กว่า เช่น 3-hydroxyl-C4-HSL และเมื่อพิจารณาโครมาโตแกรมของสารสกัดจากโคโลนีของ *Salmonella* sp. ATCC 13311 แสดงดังรูปที่ 4.6 พบว่าไม่ปรากฏพีคหลักขึ้นที่เวลาใดๆ แสดงว่าในสารชะของแบคทีเรียชนิดนี้ไม่มีสารที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับสารในกลุ่ม AHL ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ว่า *Salmonella* sp. เป็นแบคทีเรียที่ไม่สร้างสารในกลุ่ม AHL หรือเป็น non-AHL production strains (Walters และ Sperandio, 2006) ส่วนพีคบริเวณอื่นๆที่ปรากฏในโครมาโตแกรมของสารสกัดจากแบคทีเรียทั้งสามชนิด น่าจะเกิดจากสารอื่นๆที่แบคทีเรียสร้างขึ้นและมีโครงสร้างที่มีหมู่ carboxyl ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 210 นาโนเมตรได้ ซึ่งเป็นช่วงความยาวคลื่นของ UV-detector ที่ใช้ในการทดลองนี้ สารเหล่านี้อาจได้แก่ กลูโคสและโปรตีนที่ปนเปื้อนมาจากเซลล์ที่แตกเสียหาย แต่อย่างไรก็ตามสารเหล่านี้มีปริมาณต่ำกว่า AHL มาก ดังนั้นจากการทดลองนี้จึงบ่งชี้ได้ว่า *V. parahaemolyticus* ทั้งสองสายพันธุ์นี้น่าจะสร้างสาร AHL ชนิด 3-hydroxyl-C4-HSL อย่างไรก็ตามควรตรวจสอบยืนยันโครงสร้างของสารนี้ต่อไปด้วยเครื่องมือที่สามารถใช้ในการบ่งชี้โครงสร้างหรือน้ำหนักโมเลกุลของสาร เช่น Liquid Chromatograph Mass Spectrometer (LCMS) เพื่อยืนยันชนิดของสารดังกล่าว



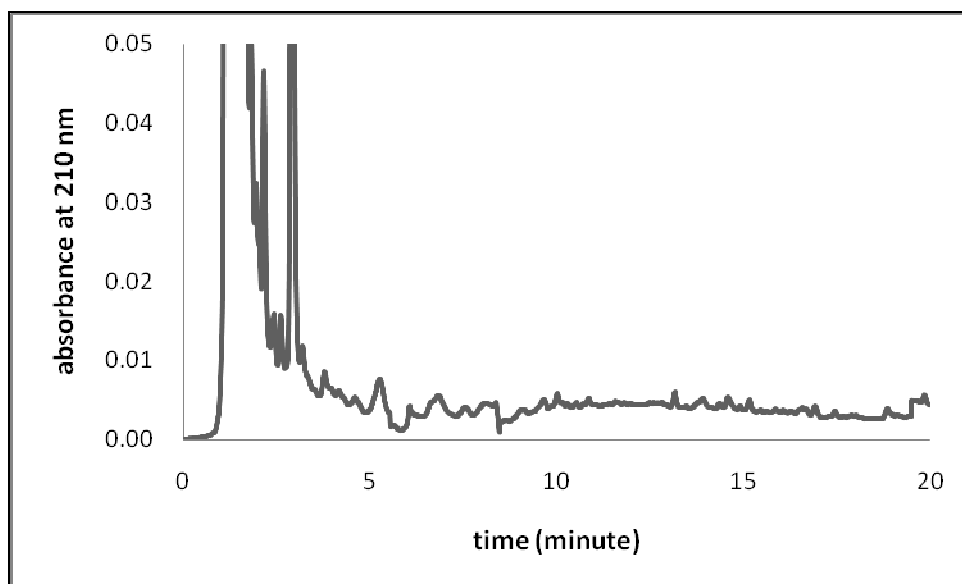
รูปที่ 4.3 โครมาโตแกรมของสาร AHL มาตรฐาน 3-oxo-C6-HSL



รูปที่ 4.4 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากโคโลนีของ *V. parahaemolyticus* DMST 22092



รูปที่ 4.5 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากโคโลนีของ *V. parahaemolyticus* DMST 22093



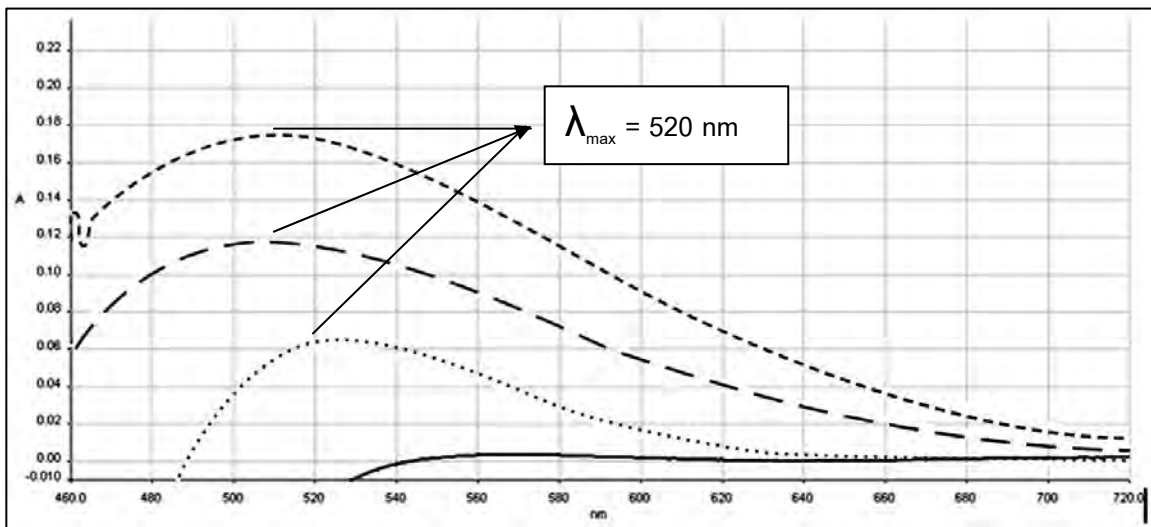
รูปที่ 4.6 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากโคโลนีของ *Salmonella* sp. ATCC 13311

4.3 ประเมินการตรวจสอบการสร้าง AHL จาก *V. parahaemolyticus* ด้วยวิธี colorimetry

การประเมินเริ่มต้นโดยการทดสอบปฏิกิริยาเคมีโดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน Ferric(III)-hydroxamate ที่เกิดขึ้นระหว่าง AHL กับสารละลาย FeCl_3 ที่เลือกจากการทดลองข้อ 4.1 โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบสีที่เกิดขึ้นด้วย spectrophotometer (ดังแสดงในรูปที่ 4.7) ซึ่งทำการประเมินใน 3 ระบบ ระบบแรกคือ การใช้สารมาตรฐานละลายในน้ำกลั่น พบว่า เมื่อนำสารมาตรฐาน 3-oxo-C6-HSL ละลายในน้ำกลั่นแล้วนำไปทำปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน Ferric(III)-hydroxamate เมื่อตรวจสอบสารประกอบสีที่เกิดขึ้น พบว่าสารประกอบดังกล่าวดูดกลืนแสงสูงสุด ที่ความยาวคลื่น (λ_{max}) ประมาณ 520 นาโนเมตร ระบบที่ 2 คือ การใช้สารมาตรฐานละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth (NB) พบว่า เมื่อนำสารมาตรฐาน 3-oxo-C6-HSL ละลายใน nutrient broth แล้วนำไปทำปฏิกิริยาแบบเดียวกัน เมื่อตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสง พบว่ายังคงมีค่า λ_{max} ที่ประมาณ 520 นาโนเมตรเพียงจุดเดียวเช่นกัน แสดงให้เห็นว่าสารประกอบต่างๆใน NB ได้แก่ peptone, NaCl, beef extract และ yeast extract ไม่ทำปฏิกิริยากับ FeCl_3 ดังนั้นจึงไม่มีอิทธิพลต่อการตรวจวัดด้วยวิธีนี้ และระบบที่ 3 คือ การใช้เซลล์เจอร์ของ *V. parahaemolyticus* ที่เพาะเลี้ยงใน NB ที่มีเกลือร้อยละ 3 พบว่าเมื่อนำส่วนใสจากเซลล์เจอร์ของ *V. parahaemolyticus* DMST 22093 ที่แยกเซลล์ออกโดยการปั่นเหวี่ยงมาทำปฏิกิริยากับ FeCl_3 เมื่อเปรียบเทียบกับสารประกอบสีที่เกิดขึ้น พบว่ามีค่า λ_{max} ประมาณ 520 นาโนเมตร เช่นเดียวกับสารมาตรฐาน สอดคล้องกับรายงานของ Yang และ

คณะ (2006) พบว่าเมื่อนำสาร AHL สังเคราะห์ชนิดต่างๆมาทำปฏิกิริยากับ FeCl_3 จะได้สารประกอบสีที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 520 นาโนเมตร ดังนั้นสารประกอบสีที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาของ FeCl_3 กับสารในส่วนใสของคัลเจอร์ของ *V. parahaemolyticus* จึงน่าจะเกิดจากสาร AHL ที่เชื้อสร้างขึ้น

อย่างไรก็ตามเพื่อยืนยันว่าสารประกอบสีที่ได้จากคัลเจอร์ของ *V. parahaemolyticus* เกิดจากการทำปฏิกิริยาของ AHL หรือเกิดจากเมตาบอไลต์อื่นๆที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของเซลล์ จึงทดลองนำส่วนใสจากคัลเจอร์ของ *Salmonella* sp. ATCC 13311 ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่มีรายงานว่าไม่สร้าง AHL (Walters และ Sperandio, 2006) มาทำปฏิกิริยากับ FeCl_3 พบว่าเมตาบอไลต์ต่างๆที่มีอยู่ในส่วนใสของคัลเจอร์ของ *Salmonella* sp. ไม่ทำปฏิกิริยากับ FeCl_3 จึงตรวจไม่พบสารประกอบสีลักษณะเดียวกับการทดสอบในคัลเจอร์ของ *V. parahaemolyticus* ซึ่งจากผลการทดลองนี้บ่งชี้ได้ว่าสารประกอบสีที่เกิดขึ้นในคัลเจอร์ของ *V. parahaemolyticus* เกิดจากการทำปฏิกิริยาที่จำเพาะระหว่างสารละลาย FeCl_3 กับ AHL เท่านั้น ดังนั้นวิธีนี้จึงสามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบ AHL ที่สร้างจากเซลล์ *V. parahaemolyticus* ในระบบอาหารเลี้ยงเชื้อในการทดลองต่อไปได้



รูปที่ 4.7 absorption spectrum ของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง FeCl_3 กับ สารมาตรฐาน 3-oxo-C6-HSL ที่ละลายในน้ำกลั่น (---), สารมาตรฐาน 3-oxo-C6-HSL ละลายใน nutrient broth (- -), ส่วนใสจากคัลเจอร์ของ *V. parahaemolyticus* DMST 22093 (AHL positive) (.....) และ ส่วนใสจากคัลเจอร์ของ *Salmonella* sp. ATCC 13811 (AHL negative) (—)

ดังที่ได้กล่าวไว้แล้วว่า วิธีการตรวจสอบ AHL ด้วยปฏิกิริยานี้ได้พัฒนาโดย รัชชิตา เดชอุดม (2550) ซึ่งได้ทำการประเมินความถูกต้อง (method validation) พบว่าวิธีนี้มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะใช้ในการตรวจสอบ AHL ได้อย่างถูกต้อง (accuracy) และแม่นยำ (precision) (ไม่แสดงผลการทดลอง) นอกจากนี้รัชชิตา เดชอุดม (2550) ยังรายงานไว้ว่า ปัจจัยภายใน ได้แก่ สายพันธุ์และระยะเวลาเจริญ และปัจจัยภายนอก ได้แก่ อุณหภูมิ และองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่มีผลต่อสมบัติการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus* ยกเว้นความเข้มข้นเกลือ และเนื่องจากการสร้าง AHL ในระดับสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่าง (ภาคผนวก ค ตาราง ค.1) ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือก *V. parahaemolyticus* DMST 22093 เป็นตัวแทนในการศึกษาในขั้นตอนต่อไปเพียงสายพันธุ์เดียว

4.4 ศึกษาสมบัติการสร้างสาร AHL ของ *V. parahaemolyticus* ภายใต้สภาวะที่มีเกลือด้วยวิธี colorimetry

4.4.1 ประเมินความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus เป็นจุลินทรีย์ที่ชอบเจริญในสภาวะที่มีเกลือ ตามมาตรฐานของ Bacteriological analytical manual online (BAM), USFDA, (May 2004) จึงใช้เกลือที่ความเข้มข้นต่างๆในการคัดแยก species ภายใน genus *Vibrio* และเกลือยังสามารถใช้ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียใน genus อื่นๆไม่ให้เจริญแข่งกับ *V. parahaemolyticus* ในระบบการตรวจสอบได้ด้วย ดังนั้นเพื่อพัฒนาการใช้วิธีทาง colorimetry ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* โดยอาศัยสมบัติการสร้าง AHL จึงต้องประเมินสมบัติการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus* ภายใต้สภาวะที่มีเกลือ โดยทดลองเพาะเลี้ยง *V. parahaemolyticus* ในอาหาร peptone water (ร้อยละ 1) ที่มีเกลือความเข้มข้นแตกต่างกัน 5 ระดับ ได้แก่ ร้อยละ 0, 3, 6, 8 และ 10 ตามลำดับ ประเมินการเจริญและการสร้าง AHL ในระหว่างการเพาะเลี้ยงที่เวลา 12, 18 และ 24 ชั่วโมง พร้อมทั้งเปรียบเทียบปริมาณ AHL ที่เชื้อในแต่ละระบบสร้างขึ้นต่อหน่วยเซลล์ โดยคำนวณในค่าของ %measured absorbance (เพื่อปรับปริมาณเซลล์ให้อยู่ในค่าเดียวกันหรือฐานเดียวกัน (normalization)) ดังสมการ (2)

$$\% \text{measured absorbance} = \frac{\text{ค่า OD}_{520} \times 100}{\text{จำนวนเซลล์ (logCFU/ml)}} \quad (2)$$

ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.3 พบว่า ภายใต้อุณหภูมิ 0 และ 10 องศาเซลเซียส ไม่พบการเจริญและการสร้าง AHL ซึ่งบ่งชี้ด้วยค่า OD₅₂₀ ของ *V. parahaemolyticus* ในขณะที่ภายใต้อุณหภูมิ 3, 6 และ 8 องศาเซลเซียส พบการเจริญของ *V. parahaemolyticus* โดยแบคทีเรียชนิดนี้จะเจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีเกลือร้อยละ 3 สามารถเจริญถึงจำนวนเซลล์ 9.23logCFU/ml ได้ภายในเวลา 12 ชั่วโมง การเจริญจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้น โดยพบว่าที่เวลา 12 ชั่วโมง ในสภาวะเกลือร้อยละ 6 *V. parahaemolyticus* เจริญได้จำนวนเซลล์ 8.96logCFU/ml ส่วนในสภาวะเกลือร้อยละ 8 เจริญได้เพียง 8.18logCFU/ml

เมื่อตรวจสอบการสร้าง AHL ในทุกความเข้มข้นเกลือ พบว่าปริมาณ AHL ที่ตรวจวัดได้ในค่า OD₅₂₀ จะเพิ่มขึ้นตามจำนวนเซลล์ และพบสิ่งที่น่าสนใจ คือ เมื่อ *V. parahaemolyticus* เจริญถึงจำนวนเซลล์ประมาณ 9logCFU/ml ในทุกความเข้มข้นเกลือ ค่า AHL ที่ตรวจวัดได้จะมีค่าเท่ากับ 0.1 (OD₅₂₀) เสมอ นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ AHL ในค่าของ %measured absorbance (%MS) ดังที่แสดงในตารางที่ 4.3 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าที่สภาวะเกลือร้อยละ 3 มีค่า %MS สูงที่สุด รองลงมาคือ ร้อยละ 6 และร้อยละ 8 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเมื่อเซลล์เจริญในเกลือความเข้มข้นต่ำจะสร้าง AHL ได้มากกว่า

ซึ่งผลการทดลองนี้ไม่สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ได้แก่ Sewald และคณะ (2007) ที่ศึกษาอิทธิพลของเกลือและคลอไรด์ต่อการเหนี่ยวนำการสร้างสัญญาณควอรัมเซนซิงชนิด autoinducer-2 (AI-2) ของโปรตีน LuxS ในแบคทีเรียจำพวก halophilic คือ *Halobacillus halophilus* (DSMZ 2266) ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มเดียวกับ *V. parahaemolyticus* โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหาร NB ที่เติม sodium chloride, sodium nitrate และ magnesium sulfate โดยพบว่าการถอดรหัสของโปรตีน LuxS นอกจากขึ้นอยู่กับระยะเวลาการเจริญแล้ว ยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเกลือที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย ซึ่งผู้วิจัยอธิบายว่าเมื่อมีความเข้มข้นของเกลือสูงจะเหนี่ยวนำการทำงานของโปรตีน LuxS ให้เกิดการสร้างสัญญาณควอรัมเซนซิงที่สูงขึ้น นอกจากนี้ รัชชิตา เดชอุดม (2550) ยังรายงานผลการศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสร้างสัญญาณควอรัมเซนซิงชนิด autoinducer-1 หรือ AHL ของ *V. parahaemolyticus* ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร NB พบว่าสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นสูง จะสามารถเหนี่ยวนำการสร้างสัญญาณควอรัมเซนซิงให้สูงขึ้นได้เช่นกัน อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงปัจจัยที่อาจทำให้ผลการทดลองที่ได้ในการศึกษานี้มีความแตกต่างจากรายงานเหล่านี้พบว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับชนิดของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

ในงานวิจัยที่กล่าวถึงนั้น ระบบอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงคือ NB ซึ่งเป็นอาหารอุดม ในขณะที่การทดลองนี้ใช้ peptone water ซึ่งเป็นเพียง pre-enrichment media ที่ขาดส่วนผสมของ yeast extract และ beef extract ซึ่งทั้งสองส่วนผสมนี้มีส่วนประกอบของกรดอะมิโน

ในหลากหลายชนิดที่สำคัญ ที่อาจถูกใช้ในการเป็นวัตถุดิบในกระบวนการแสดงออกทางพันธุกรรมของยีนในนี้คือ *lux* gene โดยกรดอะมิโนเหล่านี้อาจถูกนำไปใช้ในการสร้างเป็น functional protein ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สาร AHL ดังนั้นการเพาะเลี้ยงใน peptone water จึงเป็นไปได้ที่เกลืออาจเหนี่ยวนำให้ *lux* gene เกิดการแสดงออกเพื่อเพิ่มอัตราการสร้าง AHL แต่อาจขาดกรดอะมิโนดังกล่าวที่จะใช้ในการเป็นวัตถุดิบเพื่อเหนี่ยวนำการแสดงออกทางพันธุกรรมของยีนนี้ ดังนั้นจึงไม่พบการเหนี่ยวนำการสร้าง AHL ได้เหมือนกับการเพาะเลี้ยงในระบบอาหารอุดม ในขณะที่เดียวกัน ค่า %MS บ่งชี้ด้วยว่าในเกลือร้อยละ 3 ค่า AHL ที่ตรวจวัดได้จะสูงกว่าในเกลือร้อยละ 6 และ 8 ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องจาก *V. parahaemolyticus* สร้าง AHL แบบ up-regulation (ดูคำอธิบายในหน้า 56) โดยที่เซลล์จะสร้าง AHL ในอัตราที่สูงขึ้นเมื่อจำนวนเซลล์สูงขึ้น ดังนั้นในเกลือร้อยละ 3 ซึ่งมีเซลล์เจริญได้ดีกว่า และมีจำนวนเซลล์ต่อหน่วยมิลลิตรของอาหารหนาแน่นกว่าที่เวลาการเพาะเลี้ยงเดียวกัน จึงตรวจพบ AHL (OD_{520}) ได้สูงกว่า แต่อย่างไรก็ตามปริมาณ AHL ที่เชื้อสร้างขึ้นในเกลือร้อยละ 6 และ 8 ก็ยังคงแปรผันตามจำนวนเซลล์ ทำให้ยังคงสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการตรวจสอบจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ได้โดยอาศัยปริมาณ AHL (OD_{520}) เป็นตัวบ่งชี้

ตารางที่ 4.3 การเจริญและการสร้าง AHL ภายใต้สภาวะที่มีเกลือที่เวลาต่างๆ

ร้อยละ ของเกลือ	จำนวนเซลล์ (logCFU/ml) ^A			ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร ^B			%measure absorbance		
	12 ชั่วโมง	18 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	12 ชั่วโมง	18 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	12 ชั่วโมง	18 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
0	NG	NG	NG	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3	9.23 ^a ±0.08	9.54 ^a ±0.04	9.71 ^a ±0.07	0.116 ^a ±0.003	0.152 ^a ±0.005	0.172 ^a ±0.003	1.257 ^a ±0.009	1.593 ^a ±0.047	1.771 ^a ±0.040
6	8.93 ^b ±0.04	9.36 ^b ±0.03	9.48 ^a ±0.04	0.031 ^b ±0.006	0.136 ^b ±0.004	0.159 ^b ±0.001	0.347 ^b ±0.019	1.453 ^b ±0.066	1.677 ^b ±0.009
8	8.18 ^c ±0.05	9.16 ^c ±0.02	9.24 ^b ±0.05	0.024 ^b ±0.004	0.096 ^c ±0.004	0.118 ^c ±0.002	0.293 ^c ±0.012	1.048 ^c ±0.071	1.277 ^c ±0.043
10	NG	NG	NG	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

^{A, B} ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 2 ซ้ำ

^{a, b, c, ...} ค่าที่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

NG คือ ตรวจไม่พบการเจริญ

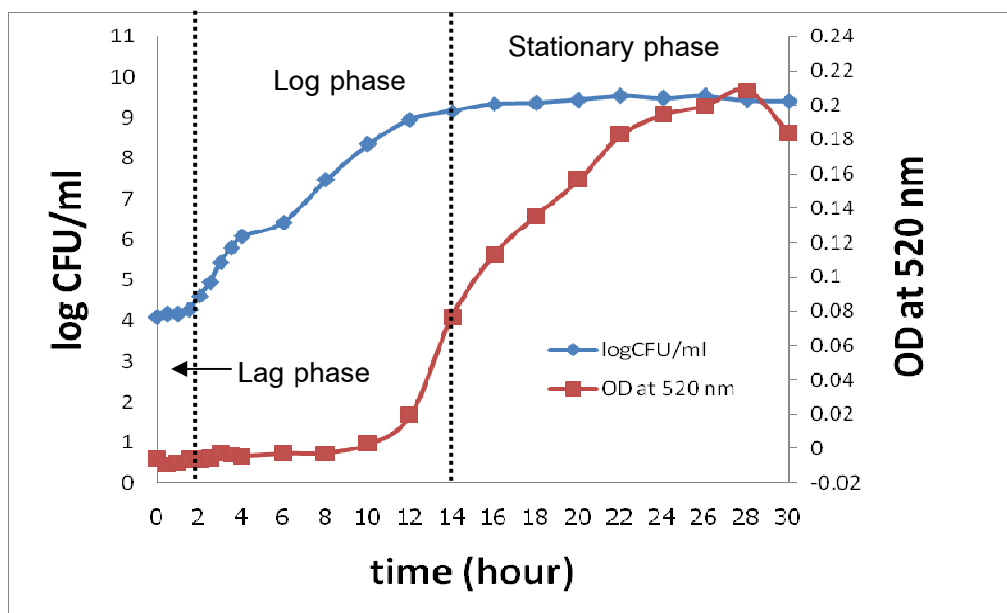
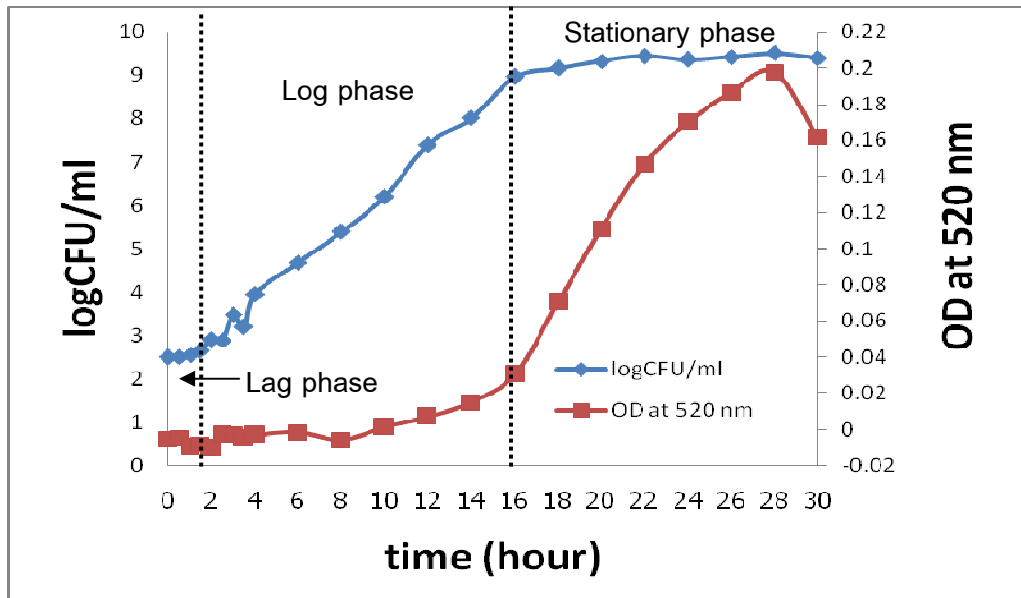
4.4.2 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์กับอัตราการเจริญและการสร้าง AHL ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเกลือที่เหมาะสม

จากผลการทดลองการประเมินสภาวะเกลือในข้อ 4.4.1 ถึงแม้ว่าที่สภาวะเกลือร้อยละ 3 *V. parahaemolyticus* เจริญได้ดีที่สุด แต่ในการศึกษาต่อไปเลือกสภาวะการเลี้ยง *V. parahaemolyticus* ที่มีเกลือร้อยละ 6 และร้อยละ 8 มาศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญกับการสร้าง AHL เนื่องจากเป็นสภาวะที่ selective ต่อ *V. parahaemolyticus* มากกว่าที่ร้อยละ 3 โดยเพาะเลี้ยง *V. parahaemolyticus* ที่สภาวะเกลือทั้ง 2 ความเข้มข้น และแปรจำนวนเซลล์เริ่มต้นในทั้ง 2 ระบบ เป็น 2 logCFU/ml และ 4 logCFU/ml ติดตามการเจริญและการสร้าง AHL ในชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมง 4 ทุกๆครึ่งชั่วโมง หลังจากนั้นติดตามทุกๆ 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 30 ชั่วโมง แล้วประเมินอัตราการเจริญในค่า specific growth rate (μ) ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.8 ถึง 4.9

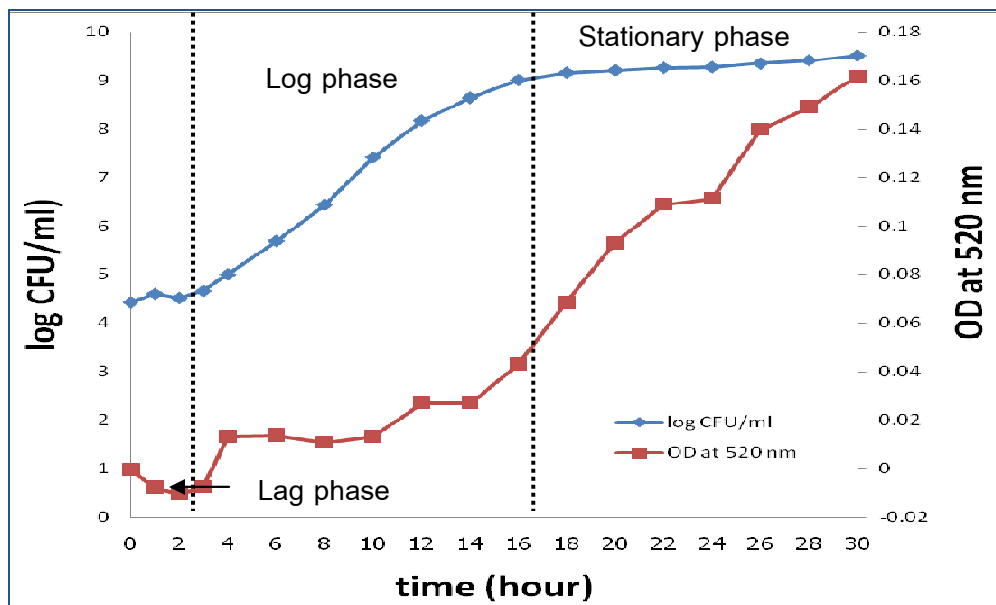
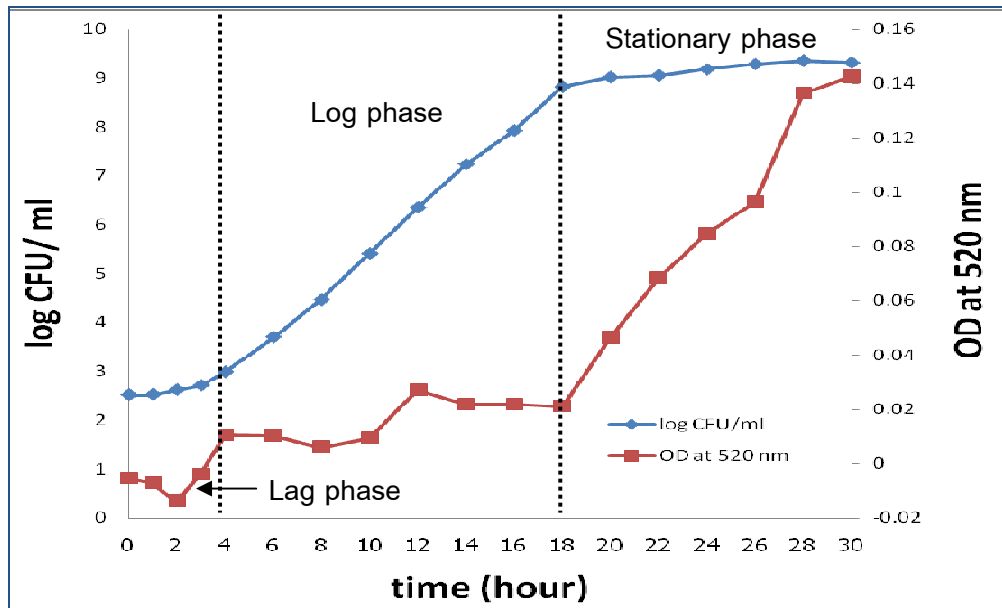
จากรูปที่ 4.8 การเพาะเลี้ยง *V. parahaemolyticus* ภายใต้สภาวะเกลือความเข้มข้นร้อยละ 6 เมื่อในระบบมีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 2.35logCFU/ml (รูปที่ 4.8 a) พบว่าการเจริญจะคงที่ในช่วง lag phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 2 จากนั้นจะเจริญเข้าสู่ระยะ log phase ในชั่วโมงที่ 3 ถึงชั่วโมงที่ 14 ซึ่งในระยะนี้ *V. parahaemolyticus* มีการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วจนถึงจำนวนเซลล์ประมาณ 9logCFU/ml แล้วจะเข้าสู่ระยะ stationary phase ในชั่วโมงที่ 16 ประเมินอัตราการเจริญในค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate, μ) ได้ค่าเท่ากับ 1.11 generation/hr ส่วนการเพาะเลี้ยงที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ 4.1logCFU/ml (รูปที่ 4.8 b) พบว่ายังคงมีรูปแบบการเจริญเช่นเดียวกัน แต่ใช้เวลาการเจริญเพิ่มจำนวนจนถึงจำนวนเซลล์ 9logCFU/ml สั้นกว่า คือเข้าสู่ระยะ stationary phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 14 ประเมินอัตราการเจริญในค่า μ ได้ใกล้เคียงกับระบบ 2logCFU/ml คือเท่ากับ 1.12 generation/hr

จากรูปที่ 4.9 การเพาะเลี้ยง *V. parahaemolyticus* ภายใต้สภาวะเกลือความเข้มข้นร้อยละ 8 เมื่อในระบบมีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 2.48logCFU/ml (รูปที่ 4.9 a) พบว่าการเจริญอยู่ในระยะ lag phase จะยาวกว่าที่เกลือร้อยละ 6 คือใช้เวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นจึงเข้าสู่ระยะ log phase ในชั่วโมงที่ 5 ถึงชั่วโมงที่ 16 ซึ่งในระยะนี้ *V. parahaemolyticus* มีการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วจนถึงจำนวนเซลล์ประมาณ 9logCFU/ml แล้วจะเข้าสู่ระยะ stationary phase ในชั่วโมงที่ 18 อัตราการเจริญที่ประเมินในค่าของอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate, μ) จะมีค่าต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงในเกลือร้อยละ 6 คือมีค่าเพียง 0.71 generation/hr ส่วนการเพาะเลี้ยงที่จำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 4logCFU/ml (รูปที่ 4.9 b) พบว่ายังคงมีรูปแบบการเจริญเช่นเดียวกัน แต่ใช้เวลาการเจริญเพิ่มจำนวนจนถึงจำนวนเซลล์ 9logCFU/ml สั้นกว่า คือเข้า

สู่ระยะ stationary phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 16 ประเมินอัตราการเจริญในค่า μ ได้ใกล้เคียงกับระบบ $2\log\text{CFU/ml}$ คือเท่ากับ $0.74 \text{ generation/hr}$



รูปที่ 4.8 อัตราการเจริญและการสร้างสัญญาณ AHL บ่งชี้ในค่าของ OD_{520} ที่ตรวจวัดด้วยวิธี colorimetry ของ *V. parahaemolyticus* DMST 22093 ภายใต้สภาวะที่มีเกลือร้อยละ 6 ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น $2 \log\text{CFU/ml}$ (a) และ $4 \log\text{CFU/ml}$ (b)



รูปที่ 4.9 อัตราการเจริญและการสร้างสัญญาณ AHL บ่งชี้ในค่าของ OD₅₂₀ ที่ตรวจวัดด้วยวิธี colorimetry ของ *V. parahaemolyticus* DMST 22093 ภายใต้สภาวะที่มีเกลือร้อยละ 8 ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น 2 logCFU/ml (a) และ 4 logCFU/ml (b)

จากผลการทดลอง เมื่อพิจารณาถึงการเพาะเลี้ยง *V. parahaemolyticus* ภายใต้สภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นเดียวกัน พบว่า แม้จะมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นในระบบต่างกัน แต่ก็ไม่มีความแตกต่างต่อรูปแบบและอัตราการเจริญของ *V. parahaemolyticus* อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาถึงการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเกลือที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มี

เกลือร้อยละ 6 ให้อัตราการเจริญของ *V. parahaemolyticus* สูงกว่าการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีเกลือร้อยละ 8 แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของเกลือมีอิทธิพลต่อการเจริญของ *V. parahaemolyticus* ทั้งนี้เนื่องจากในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นสูงๆ จะเกิดภาวะ osmotic stress ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ ส่งผลให้เซลล์มีการเจริญช้าลง มีรายงานว่าในภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นสูง *V. parahaemolyticus* จะปรับตัวต่อภาวะ osmotic stress โดยการสร้างและสะสมสารจำพวก compatible solutes หรือ osmolytes เช่น น้ำตาลหรือกรดอะมิโน เพื่อการอยู่รอดของเซลล์ (Naughton และคณะ, 2009) ส่งผลให้เซลล์ลดการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนประชากร

เมื่อพิจารณารูปแบบการสร้าง AHL โดยการตรวจวัดและแสดงในค่า OD₅₂₀ จะเห็นได้ว่าในทุกสภาวะการเพาะเลี้ยง ทุกช่วงการเจริญของ *V. parahaemolyticus* ค่า OD₅₂₀ จะแปรผันตามจำนวนเซลล์ โดยในระยะ lag phase ตรวจไม่พบ AHL กล่าวคือ ค่าการดูดกลืนแสง (OD₅₂₀) ที่ตรวจวัดได้มีค่าประมาณศูนย์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความไวของวิธีและเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดอาจไวไม่พอที่จะตรวจวัด AHL ในปริมาณต่ำที่ระยะ lag phase ได้ แต่ในระยะ log phase จะเริ่มตรวจวัดปริมาณ AHL ได้และจะเริ่มตรวจวัดได้อย่างถูกต้องตามมาตรฐานของ USFDA guideline, 2001 (%RSD < ±15%) เมื่อ *V. parahaemolyticus* เจริญเพิ่มจำนวนจนมีจำนวนเซลล์ประมาณ 6logCFU/ml โดยจะตรวจวัดค่า OD₅₂₀ ได้ประมาณ 0.01 ทั้งนี้ค่า OD₅₂₀ จะเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว เมื่อเซลล์เจริญเข้าสู่ช่วงปลายของระยะ log phase หรือเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase และจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดช่วงการเจริญในระยะ stationary phase นอกจากนี้พบว่าเมื่อเชื้อในทุกระบบเจริญจนมีจำนวนเซลล์สูงถึง 9.3 logCFU/ml ค่า OD₅₂₀ ที่ตรวจวัดได้จะมีค่า 0.11 เหมือนกันทุกระบบ

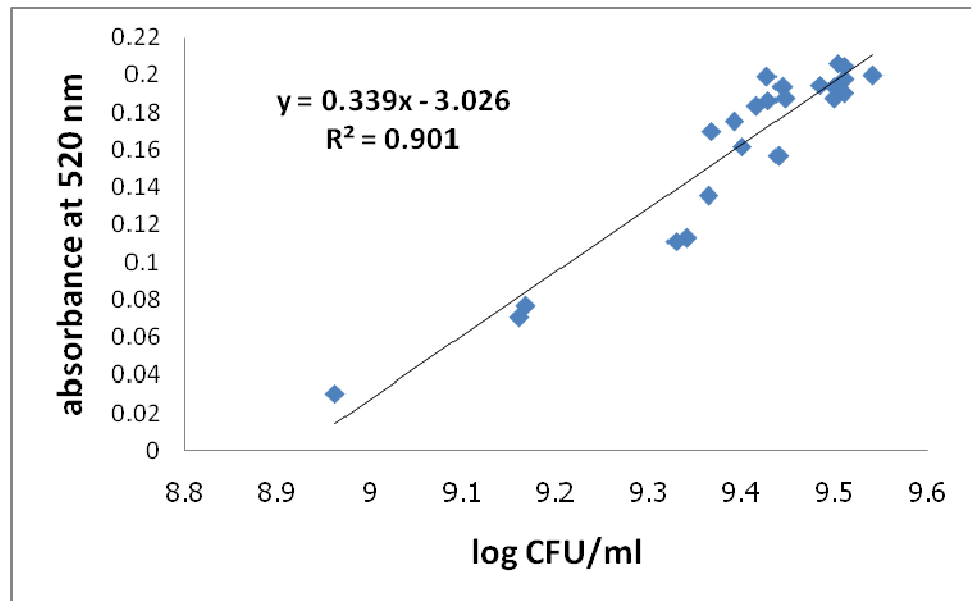
เมื่อพิจารณาอัตราการเพิ่มของจำนวนเซลล์และอัตราการเพิ่มของปริมาณ AHL ในค่าของความชัน (slope of linear regression line, m) แสดงดังตารางที่ 4.4 พบว่าทุกสภาวะการเพาะเลี้ยง อัตราการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ในระยะ log phase (m = 0.404–0.434) สูงกว่าอัตราการเพิ่มขึ้นของค่า OD₅₂₀ (m = 0.001–0.002) แต่ในระยะ stationary phase อัตราการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์จะต่ำลง (m = 0.008–0.031) ในขณะที่อัตราการเพิ่มของค่า OD₅₂₀ นั้นมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นกว่าในระยะ log phase (m = 0.008–0.01) จากผลการทดลองเมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่า OD₅₂₀ ซึ่งบ่งชี้ถึงปริมาณ AHL ที่ *V. parahaemolyticus* สร้างขึ้น แสดงให้เห็นว่าอัตราการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus* ไม่มีความสัมพันธ์กับอัตราการเจริญ

ตารางที่ 4.4 อัตราการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์และอัตราการเพิ่มขึ้นของปริมาณ AHL ที่ *V. parahaemolyticus* สร้างขึ้น แสดงในค่าของความชัน (m)

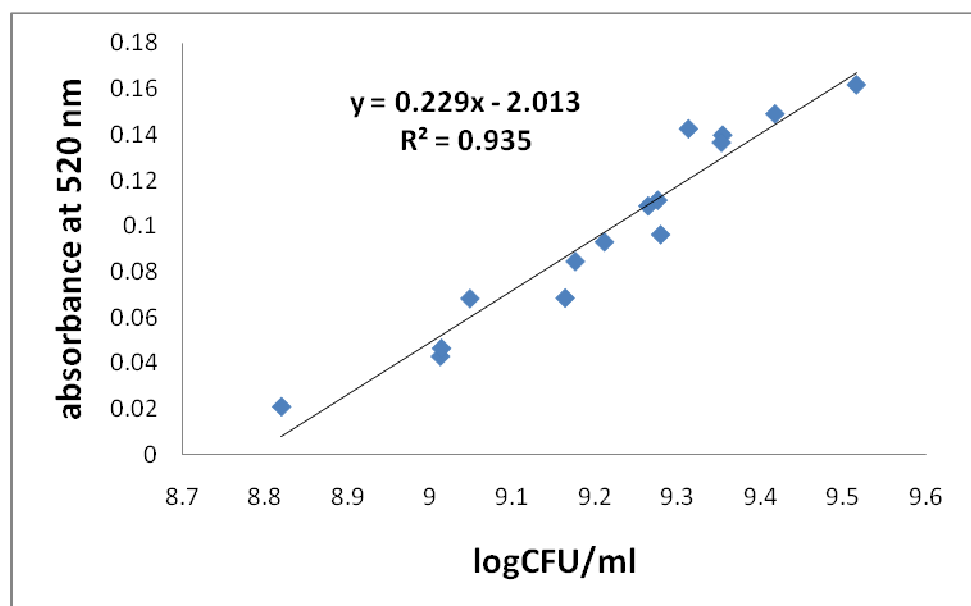
สภาวะการเพาะเลี้ยง	อัตราการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ (m)				อัตราการเพิ่มขึ้นของปริมาณ AHL (m)			
	Log phase		Stationary phase		Log phase		Stationary phase	
	2logCFU/ml	4logCFU/ml	2logCFU/ml	4logCFU/ml	2logCFU/ml	4logCFU/ml	2logCFU/ml	4logCFU/ml
Peptone water + เกลือร้อยละ 6	0.434±0.007	0.424±0.005	0.008±0.002	0.006±0.003	0.002±0.006	0.002±0.008	0.010±0.002	0.009±0.005
Peptone water + เกลือร้อยละ 8	0.424±0.003	0.404±0.005	0.029±0.007	0.031±0.003	0.001±0.009	0.001±0.003	0.010±0.002	0.008±0.007

มีรายงานกล่าวไว้ว่าการสร้างสัญญาณ AHL ในแบคทีเรียสามารถเกิดขึ้นได้ 2 รูปแบบ รูปแบบแรกคือ อัตราการสร้าง AHL ขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญของแบคทีเรียเท่านั้น ซึ่งเรียกว่า constitutive production คณะผู้วิจัยได้อธิบายไว้ว่าแบคทีเรียในกลุ่มนี้ เมื่อการสร้าง AHL เพิ่มขึ้นถึงระดับหนึ่งแล้ว (threshold level) จะเหนี่ยวนำกระบวนการทางพันธุกรรมเพื่อให้เกิดการแสดงออกของฟีโนไทป์ในรูปแบบต่างๆ แต่ไม่ได้มีผลต่อการเหนี่ยวนำการสร้างสัญญาณ AHL ให้เพิ่มขึ้น อัตราการเพิ่มขึ้นของปริมาณ AHL มีค่าเท่ากับอัตราการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ การสร้าง AHL ในลักษณะนี้พบใน *S. liquefaciens* และ *En. agglomerans* (Gram และคณะ, 1999), *S. proteomaculans* B5a และ *E. carotovora* ATCC 39048 (Ravn และคณะ, 2001) รูปแบบที่ 2 คือรูปแบบที่อัตราการสร้าง AHL ไม่ได้ขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญของจำนวนเซลล์เพียงอย่างเดียว โมเลกุลของสัญญาณ AHL ที่สร้างขึ้นในช่วงแรก สามารถเหนี่ยวนำการสร้างสัญญาณ AHL ในช่วงต่อมาได้ (autoinducible) ซึ่งเรียกว่า up-regulation production ลักษณะเช่นนี้มีผลให้ปริมาณ AHL ต่อหนึ่งหน่วยเซลล์เพิ่มมากขึ้น (Fuqua และคณะ, 1994; Latifi และคณะ, 1995; Kuo และคณะ, 1996) ดังนั้นเมื่อพิจารณาการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus* น่าจะจัดอยู่ในกลุ่ม up-regulation production

จากข้อมูลจำนวนเซลล์และปริมาณ AHL ที่ติดตามจากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเกล็ดอ้อยละ 6 และ 8 เมื่อนำมาประเมินความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ (logCFU/ml) กับปริมาณ AHL (OD_{520}) ในช่วงที่ตรวจวัดได้ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.10 และ 4.11 ตามลำดับ พบว่า ปริมาณ AHL จะเริ่มมีความเข้มข้นถึงในระดับที่ตรวจวัดได้อย่างแม่นยำ (precision) โดยใช้เกณฑ์การตรวจวัดที่มีความแม่นยำที่ %RSD ไม่เกิน $\pm 15\%$ ได้ในช่วงปลายของ log phase และจะพบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ในช่วงปลายของ log phase ($>8.8 \log CFU/ml$) กับปริมาณ AHL ที่ตรวจวัดได้ (%RSD ไม่เกิน $\pm 15\%$) ในค่าของค่า OD_{520} (≥ 0.02) มีความสัมพันธ์กันเป็นเส้นตรง มีค่า r^2 มากกว่า 0.9 แสดงให้เห็นว่าปริมาณ AHL ในช่วงดังกล่าวสามารถใช้เป็นตัวแทนในการบ่งชี้จำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* จึงน่าจะสามารถพัฒนาเป็นวิธีการตรวจสอบจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* โดยอาศัยปริมาณ AHL เป็นตัวบ่งชี้ได้



รูปที่ 4.10 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ (logCFU/ml) กับปริมาณ AHL ตรวจวัดในค่า OD₅₂₀ ในช่วงที่ตรวจวัดได้ที่เพาะเลี้ยงใน peptone water (ร้อยละ 1) ที่มีเกลือร้อยละ 6 ภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้อง และให้อากาศแบบ orbital shaking ที่ 200 rpm



รูปที่ 4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ (logCFU/ml) กับปริมาณ AHL ตรวจวัดในค่า OD₅₂₀ ในช่วงที่ตรวจวัดได้ที่เพาะเลี้ยงใน peptone water (ร้อยละ 1) ที่มีเกลือร้อยละ 8 ภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้อง และให้อากาศแบบ orbital shaking ที่ 200 rpm

ในการทดลองประเมินการใช้ AHL ในการทำนายจำนวนเซลล์ โดยเฉพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเกลื่อนนั้นถึงแม้ว่าในสภาวะที่มีเกลือร้อยละ 6 *V. parahaemolyticus* จะเจริญได้ดีกว่าในสภาวะที่มีเกลือร้อยละ 8 ซึ่งประเมินจากอัตราการเจริญแล้วพบว่าภายใต้สภาวะเกลือร้อยละ 6 *V. parahaemolyticus* เจริญเร็วกว่าประมาณ 2 ชั่วโมง แต่เมื่อพิจารณาถึงสภาวะ selective ต่อ *V. parahaemolyticus* ตามมาตรฐานของ Bacteriological analytical manual online (BAM), USFDA, (May 2004) จะพบว่าในสภาวะเกลือร้อยละ 8 จะมีความเหมาะสมมากกว่า (ดังที่แสดงในการตรวจเอกสารหน้า 5 ตาราง 2.1) กล่าวคือ ภายใต้สภาวะเกลือร้อยละ 8 พบแบคทีเรียชนิดอื่นในจีนัส *Vibrio* เจริญได้ทั้งหมด 2 ชนิด ได้แก่ *V. alginolyticus* และ *V. furnissii* ส่วนภายใต้สภาวะเกลือร้อยละ 6 พบแบคทีเรียชนิดอื่นในจีนัส *Vibrio* เจริญได้ทั้งหมด 7 ชนิดได้ ได้แก่ *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. hollisae*, *V. metschnikovii*, *V. vulnificus* และ *A. hydrophila* ดังนั้นในสภาวะที่มีเกลือร้อยละ 6 คงไม่มีสภาวะ selective มากพอที่จะนำไปประยุกต์ใช้เป็น selective media สำหรับใช้ในระบบการตรวจสอบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างอาหารทะเลได้ ส่วนแบคทีเรียในกลุ่มที่สามารถเจริญได้ในสภาวะเกลือร้อยละ 8 นั้นมีรายงานว่า *V. alginolyticus* สามารถสร้างสารในกลุ่ม AHL ได้ เป็นชนิด C12-HSL และ C6-HSL (Huang และคณะ, 2007) แต่สำหรับ *V. furnissii* ยังไม่มีรายงานว่าสร้างสารในกลุ่ม AHL ได้ อย่างไรก็ตามแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ไม่ได้จัดอยู่ในกลุ่มที่มีรายงานว่าพบการปนเปื้อนบ่อยครั้งในอาหารทะเล (Lake และคณะ, 2003) ดังนั้นการเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือร้อยละ 8 โดยใช้ peptone water (ร้อยละ 1, ซึ่งโดยทั่วไปใช้เป็น pre-enrichment media ในระบบการวิเคราะห์จุลินทรีย์ในอาหาร) เป็นระบบ selective pre-enrichment media น่าจะเป็นระบบที่มีศักยภาพพอที่จะนำไปใช้ในการพัฒนาเป็นระบบตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ด้วยการตรวจวัด AHL

จากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาทั้งหมดเบื้องต้น จึงจะประเมินการตรวจสอบจำนวน *V. parahaemolyticus* โดยเฉพาะเลี้ยงใน peptone water (ร้อยละ 1) ที่มีเกลือร้อยละ 8 ภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้อง และให้อากาศแบบ orbital shaking ที่ 200 rpm เพื่อให้เชื้อเริ่มต้นเพิ่มจำนวนมากขึ้นจนสร้าง AHL ถึงระดับที่ $OD_{520} \geq 0.1$ โดยเวลาที่ใช้ในการเจริญจนสร้าง AHL ถึงระดับที่ตรวจวัดได้ดังกล่าว เรียกว่า detection time (DT) แล้วใช้ค่า DT ในการทำนายจำนวนเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* เริ่มต้น ดังแสดงในการทดลองต่อไป

4.4.3 ศึกษาการเจริญและการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus* ที่ระดับเซลล์เริ่มต้นต่างๆ

ในขั้นตอนนี้ทดลองตรวจสอบค่า DT ของ *V. parahaemolyticus* ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น 1log, 2log, 3log, 4log, 5log, 6log, 7log และ 8logCFU/ml ที่เพาะเลี้ยงในระบบ selective pre-enrichment media ภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้อง และให้อากาศแบบ orbital shaking ที่ 200 rpm ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.5a และ 4.5b พบว่า ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงในระบบ selective pre-enrichment media นี้ เมื่อมีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 1.47, 2.38, 3.40, 4.42, 5.30, 6.24, 7.18 และ 8.06 logCFU/ml เซลล์จะเจริญถึง 9.1logCFU/ml ที่เวลา 26, 24, 22, 20, 16, 14, 12 และ 10 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตาราง 4.5a) และตรวจวัดค่า OD₅₂₀ ได้เท่ากับ 0.1 ได้ที่เวลาเดียวกัน (ตาราง 4.5b) ดังนั้นค่า DT ของที่ระดับเซลล์เริ่มต้น 1log, 2log, 3log, 4log, 5log, 6log, 7log และ 8logCFU/ml จึงมีค่าเท่ากับ 26, 24, 22, 20, 16, 14, 12 และ 10 ชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ จากข้อมูลที่ได้ยังตรวจพบว่า ที่ทุกระดับจำนวนเซลล์เริ่มต้น เมื่อเชื้อเจริญถึงจำนวนเซลล์ประมาณ 9.1logCFU/ml จะสร้าง AHL ถึงระดับ OD₅₂₀ เท่ากับ 0.1 เสมอ แสดงให้เห็นว่าปริมาณ AHL แสดงในค่า OD₅₂₀ สามารถใช้บ่งชี้จำนวนเซลล์ได้และสามารถวิเคราะห์ข้อมูลเป็นตารางต้นแบบสำหรับการประเมินจำนวนเซลล์เริ่มต้นได้ดังตารางที่ 4.6

จากข้อมูลข้างต้นเมื่อนำมาหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์เริ่มต้น (logCFU/ml) กับค่า DT พบว่าจำนวนเซลล์เริ่มต้นและค่า DT มีความสัมพันธ์กันแบบเส้นตรงตามสมการ $y = -0.386x + 11.82$ และมีค่า r^2 เท่ากับ 0.99 แสดงดังรูปที่ 4.12 จากเส้นกราฟสามารถใช้ทำนายได้ว่าถ้าในระบบมีเชื้อเริ่มต้น 11.82logCFU/ml จะสามารถตรวจวัด AHL ได้ทันทีตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 แต่ถ้าตรวจวัดไปจนถึงชั่วโมงที่ 30 แล้ว ยังตรวจไม่พบ AHL แสดงว่าในระบบไม่มีการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* จากสมการที่คำนวณได้นี้สามารถใช้ในการทำนายจำนวนเซลล์เริ่มต้นของ *V. parahaemolyticus* ในระบบอาหารเลี้ยงเชื้อ selective pre-enrichment media โดยควบคุมการเลี้ยงให้อยู่ภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้องและให้อากาศแบบ orbital shaking ที่ 200 rpm

อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่า *V. parahaemolyticus* เป็นจุลินทรีย์จำพวก facultative anaerobe แต่การให้อากาศก็ยังคงมีความสำคัญต่อความสม่ำเสมอของการเจริญ ซึ่งน่าจะมีผลต่อปริมาณ AHL ที่ตรวจวัดได้ ในงานวิจัยนี้จึงได้ทดลองเปรียบเทียบสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบให้อากาศและไม่ให้อากาศ พบว่าในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ไม่ให้อากาศ มีผลให้การเจริญของ *V. parahaemolyticus* ต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะให้อากาศมาก กล่าวคือ เมื่อทดลองเพาะเลี้ยง *V. parahaemolyticus* ในสภาวะให้อากาศ ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น 6logCFU/ml จะมีค่า DT

เท่ากับ 14 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่ให้อากาศ *V. parahaemolyticus* ต้องใช้เวลานานกว่า 30 ชั่วโมง จึงจะได้จำนวนเซลล์สูงสุดได้ถึง $8.16 \log \text{CFU/ml}$ ดังนั้นทำให้ DT ที่จะใช้ในการตรวจวัด AHL ที่ระดับเซลล์เริ่มต้นต่างๆ ยาวนานขึ้นกว่าเดิมมาก (ผลการทดลอง แสดงในภาคผนวก ค ตาราง ค.2) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Medina-Martinez (2006) ที่ศึกษาปัจจัยการสร้างสัญญาณ AHL ของ *Aeromonas* spp. โดยตรวจสอบ AHL ด้วยวิธีทางชีวภาพ (bioassay) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะไร้อากาศ จุลินทรีย์ยังสามารถเจริญได้ แต่อัตราการเจริญช้ากว่าสภาวะที่มีอากาศมาก และการสร้าง AHL ของแบคทีเรียชนิดนี้ ขึ้นอยู่กับจำนวนเซลล์ ดังนั้นเมื่อเซลล์เจริญได้ช้า การตรวจพบ AHL จึงใช้เวลานานกว่าภายใต้สภาวะที่มีอากาศมาก

ดังนั้นวิธีการที่จะพัฒนาขึ้นสำหรับใช้ในการตรวจสอบจำนวน *V. parahaemolyticus* โดยการติดตามค่า DT ที่ได้จากการตรวจสอบ AHL จึงจำเป็นต้องเพาะเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะการให้อากาศ สรุปสภาวะที่ใช้ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ได้ดังนี้ คือ เพาะเลี้ยงใน peptone water (ร้อยละ 1) ที่มีเกลือความเข้มข้นร้อยละ 8 ภายใต้สภาวะ อุณหภูมิห้องและให้อากาศแบบ orbital shaking ที่ 200 rpm

ตารางที่ 4.5a จำนวนเซลล์ (logCFU/ml) ของ *V. parahaemolyticus* DMST 22093 ที่เพาะเลี้ยงใน peptone water (ร้อยละ 1) ที่มีเกลือร้อยละ 8 ภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้องและให้อากาศแบบ orbital shaking ที่ 200 rpm ที่เวลาต่างๆ

เซลล์เริ่มต้น ^A (logCFU/ml)	จำนวนเซลล์ (logCFU/ml) ที่เวลาต่างๆ (hr)										
	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
1.47±0.06									9.16±0.04	9.20±0.05	9.33±0.07
2.38±0.04							9.03±0.01	9.18±0.01	9.27±0.03		
3.40±0.05							9.16±0.03	9.23±0.07	9.27±0.06		
4.42±0.04					9.04±0.07	9.13±0.04	9.18±0.06				
5.38±0.06			9.07±0.04	9.18±0.02	9.20±0.02						
6.24±0.05			9.18±0.02	9.22±0.06	9.24±0.06						
7.18±0.04	9.01±0.01	9.13±0.04	9.21±0.04								
8.06±0.08	9.17±0.05	9.27±0.01	9.35±0.03								

^A ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

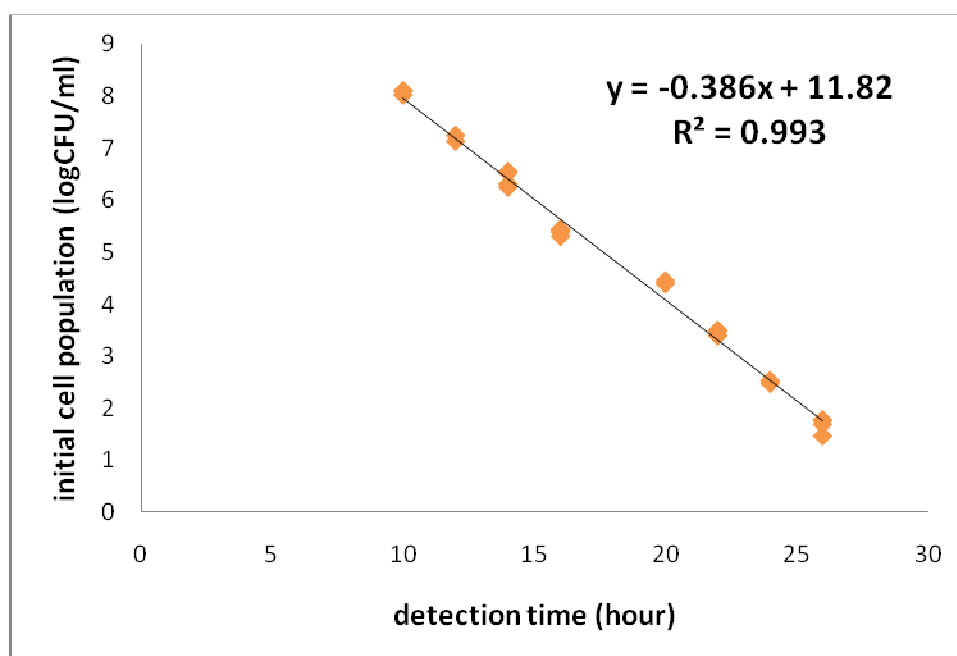
ตารางที่ 4.5b ค่า OD₅₂₀ ที่ตรวจวัดจากคัลเจอร์ของ *V. parahaemolyticus* DMST 22093 ที่เพาะเลี้ยงใน peptone water (ร้อยละ 1) ที่มีเกลือร้อยละ 8 ภายใต้สภาวะ อุณหภูมิห้องและให้อากาศแบบ orbital shaking ที่ 200 rpm ที่เวลาต่างๆ

เซลล์เริ่มต้น ^A (logCFU/ml)	ค่า OD ₅₂₀ ที่เวลาต่างๆ (hr)										
	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
1.47±0.06									0.117±0.006	0.133±0.002	0.151±0.004
2.38±0.04							0.093±0.009	0.112±0.011	0.131±0.006		
3.40±0.05							0.107±0.010	0.124±0.004	0.141±0.006		
4.42±0.04					0.083±0.012	0.104±0.005	0.114±0.004				
5.38±0.06			0.089±0.006	0.107±0.006	0.129±0.006						
6.24±0.05			0.108±0.014	0.129±0.009	0.139±0.008						
7.18±0.04	0.087±0.006	0.103±0.002	0.124±0.004								
8.06±0.08	0.109±0.002	0.128±0.003	0.141±0.005								

^A ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 4.6 ตารางต้นแบบสำหรับใช้ในการประเมินจำนวนเซลล์เริ่มต้นของ *V. parahaemolyticus*

จำนวนเซลล์เริ่มต้น (logCFU/ml)	Detection time (ชั่วโมง)
1	26
2	24
3	22
4	20
5	16
6	14
7	12
8	10



รูปที่ 4.12 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์เริ่มต้นของ *V. parahaemolyticus* (logCFU/ml) กับ detection time

4.5 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่ออัตราการเจริญและการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus*

มีงานวิจัยมากมายที่ศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและการสร้าง AHL ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ซึ่งประกอบไปด้วยปัจจัยภายใน ได้แก่ สายพันธุ์และระยะการเจริญ (Atkinson และคณะ, 1999; Geisenberger และคณะ, 2000; Blosser-Middleton และ Gray, 2001; Lithgow และคณะ, 2001 และ Byers และคณะ, 2002) ส่วนปัจจัยภายนอก ได้แก่ องค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (Geisenberger และคณะ, 2000; Lithgow และคณะ, 2001; Martinez และคณะ, 2005) และอุณหภูมิ (Atkinson และคณะ, 1999; Yates และคณะ, 2002)

Prakitchaiwattana และคณะ (2009) ศึกษาอิทธิพลของปัจจัยภายในและปัจจัยภายนอกต่อคุณสมบัติการสร้างสัญญาณ AHL ของ *V. parahaemolyticus* ทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ พบว่าสายพันธุ์และช่วงการเจริญของแบคทีเรีย รวมถึงภาวะการเลี้ยงได้แก่ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิไม่มีผลต่อการสร้างสัญญาณ AHL ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาปัจจัยอื่นๆเพิ่มเติมที่อาจมีอิทธิพลต่อรูปแบบการเจริญและการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus* และอาจส่งผลให้ค่า DT ของระบบการตรวจวัดที่ประเมินได้ในข้อ 4.4.3 มีความแปรผัน ซึ่งได้แก่ อันตรกิริยากับจุลินทรีย์ชนิดอื่น การทำให้ *V. parahaemolyticus* สัมผัสกับอุณหภูมิแช่เย็นหรือแช่เยือกแข็งก่อนการเพาะเลี้ยง และอิทธิพลจากองค์ประกอบของอาหารทะเล ผลการทดลองแสดงดังต่อไปนี้

4.5.1 อันตรกิริยากับจุลินทรีย์ชนิดอื่น

V. parahaemolyticus เป็นจุลินทรีย์ท้องถิ่นที่พบในทะเล ดังนั้นจึงมักพบการปนเปื้อนอยู่ในอาหารทะเลโดยทั่วไป แต่อย่างไรก็ตามมักพบจุลินทรีย์อื่นๆอีกหลายชนิดที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหารทะเลด้วย ซึ่งหากจะนำวิธีที่พัฒนาสำหรับตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* มาใช้ตรวจสอบแบคทีเรียชนิดนี้ในอาหารทะเลแล้ว จะต้องมีการศึกษาอิทธิพลของจุลินทรีย์ชนิดอื่นต่อสมบัติการเจริญและการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus* จึงทดลองเพาะเลี้ยง *V. parahaemolyticus* ร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้แก่ *Salmonella* sp. ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมลบ *S. aureus* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวก *V. vulnificus* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียในจีโนส *Vibrio* ที่มีรายงานว่าสร้างสัญญาณในกลุ่ม AHL ได้ โดยออกแบบการทดลองดังที่แสดงในข้อ 3.5.1 ติดตามการเจริญและการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus* เพื่อหาค่า DT และตรวจสอบการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารจำเพาะกับเชื้อแต่ละชนิด ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.7

จากตารางที่ 4.7 พบว่าในระบบการเพาะเลี้ยง *V. parahaemolyticus* เพียงชนิดเดียว ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น $4\log\text{CFU/ml}$ เซลล์จะเจริญได้ $9\log\text{CFU/ml}$ และสร้าง AHL ที่ตรวจวัดค่า OD_{520} ได้เท่ากับ 0.1 ได้ที่ชั่วโมงที่ 20 ซึ่งถือว่าเป็นค่า DT ของระบบนี้ เมื่อเพาะเลี้ยง *V. parahaemolyticus* ร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่น ได้แก่ *Salmonella* sp., *S. aureus* และ *V. vulnificus* ผลการทดลองพบว่า ติดตามค่า DT ได้เท่ากับ 20 ชั่วโมงเช่นเดิม แต่ตรวจพบว่าจำนวนเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* นั้นลดลง โดยพบการเจริญอยู่ที่จำนวนเซลล์ 8.68–8.95 $\log\text{CFU/ml}$ เท่านั้น ในขณะที่แบคทีเรียชนิดอื่นๆยังมีชีวิตอยู่ แต่ไม่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ กล่าวคือ ที่เวลา 18, 20 และ 22 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ที่ตรวจสอบได้ยังคงเท่ากับจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่เพาะเชื้อลงไป คือ ประมาณ $4\log\text{CFU/ml}$ เมื่อพิจารณาผลการตรวจวัด AHL พบว่าปริมาณ AHL ที่ตรวจวัดได้ในระบบการเพาะเลี้ยง *V. parahaemolyticus* ร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่นสูงกว่าปริมาณ AHL ที่ตรวจวัดได้จากระบบที่เพาะเลี้ยง *V. parahaemolyticus* เพียงชนิดเดียว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยพบว่าที่จำนวนเซลล์ประมาณ 8.6 $\log\text{CFU/ml}$ สามารถตรวจวัด AHL ได้ค่า OD_{520} เท่ากับ 0.11 ซึ่งในระบบที่เพาะเลี้ยง *V. parahaemolyticus* เพียงชนิดเดียวจะต้องมีจำนวนเซลล์สูงถึง 9.1 $\log\text{CFU/ml}$ จึงจะตรวจวัด AHL ได้ที่ระดับนี้

จากผลการทดลองบ่งชี้ให้เห็นว่าการมีแบคทีเรียชนิดอื่นเจริญอยู่ร่วมในระบบ มีผลให้ *V. parahaemolyticus* เจริญลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (แสดงดังตารางที่ 4.7 ตัวอักษรเข้ม) แต่สร้าง AHL ในปริมาณที่สูงขึ้น ทั้งนี้อธิบายได้ว่าการที่ *V. parahaemolyticus* เจริญร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่นนั้นเป็นการอยู่ร่วมกันแบบ Amensalism ซึ่งหมายถึง การอาศัยอยู่ร่วมกัน จะมีฝ่ายหนึ่งที่เสียประโยชน์ ส่วนอีกฝ่ายหนึ่งไม่ได้ไม่เสียประโยชน์ เมื่อแยกจากกันต่างฝ่ายต่างดำรงชีวิตอยู่ได้ตามปกติ และจากผลการทดลองนี้พบว่า เมื่อ *V. parahaemolyticus* เจริญอยู่ร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่น การเจริญจะลดลง แสดงให้เห็นว่า *V. parahaemolyticus* เป็นผู้เสียประโยชน์ ในขณะที่แบคทีเรียชนิดอื่นๆ ไม่ได้ไม่เสียประโยชน์ เนื่องจากจำนวนเซลล์ที่ตรวจพบยังคงเท่าเดิม ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า *V. parahaemolyticus* พยายามที่จะครอบครอง (dominate) ระบบด้วยการเร่งการสร้างสัญญาณ AHL เพื่อไปเหนี่ยวนำกระบวนการทางพันธุกรรมบางอย่างเพื่อให้ยังคงเป็นผู้นำอยู่ในระบบนั้นได้ ทั้งนี้ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับอันตรกิริยาของแบคทีเรียต่อการสร้าง AHL ของจุลินทรีย์ในระบบที่จะใช้อธิบายผลได้ชัดเจนมากกว่านี้ได้ อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาที่ค่า OD พบว่าปริมาณ AHL ที่เพิ่มขึ้นไม่ได้สูงพอที่จะทำให้ค่า DT เปลี่ยนแปลงไป กล่าวคือ ทุกระบบที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น $4\log\text{CFU/ml}$ ถึงแม้จะมีแบคทีเรียอื่นอยู่ในระบบก็ยังคงตรวจวัด AHL ได้ที่ค่า DT เท่ากับ 20 ชั่วโมง ดังนั้นจึงยังคงใช้สมการเส้นตรง $y = -0.386x + 11.82$ ที่ได้จากระบบการเพาะเลี้ยง *V. parahaemolyticus* เพียงชนิดเดียวในการคำนวณหาค่า DT เพื่อทำนายจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ได้เช่นเดิม

ตารางที่ 4.7 อันตรกิริยากับจุลินทรีย์ชนิดอื่นต่อการเจริญและการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus*

ชนิดของ แบคทีเรีย	จำนวนเซลล์ของแบคทีเรียแต่ละชนิด (logCFU/ml) ^A			ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร ^B		
	18 ชั่วโมง	20 ชั่วโมง	22 ชั่วโมง	18 ชั่วโมง	20 ชั่วโมง	22 ชั่วโมง
Vp	9.07 ^a ±0.04	9.13 ^a ±0.04	9.14 ^a ±0.06	0.083 ^b ±0.012	0.104 ^c ±0.005	0.114 ^a ±0.001
Vp	8.32 ^c ±0.08	8.95 ^b ±0.07	8.88 ^b ±0.04	0.095 ^a ±0.008	0.111 ^{bc} ±0.006	0.134 ^c ±0.006
Sal	4.50±0.02	4.64±0.02	4.51±0.07			
Vp	8.61 ^b ±0.05	8.88 ^b ±0.07	8.89 ^b ±0.05	0.094 ^a ±0.006	0.117 ^{ab} ±0.010	0.145 ^d ±0.007
Stap	4.65±0.01	4.85±0.08	4.80±0.02			
Vp	8.67 ^b ±0.09	8.68 ^c ±0.07	8.73 ^c ±0.08	0.093 ^a ±0.003	0.110 ^{bc} ±0.001	0.124 ^b ±0.004
Vul	4.58±0.08	4.39±0.06	4.23±0.09			
Vp	8.70 ^b ±0.09	8.84 ^b ±0.05	8.89 ^b ±0.04			
Sal	4.38±0.08	4.21±0.03	4.44±0.08	0.097 ^a ±0.003	0.127 ^a ±0.001	0.149 ^d ±0.001
Stap	4.54±0.02	4.68±0.05	4.47±0.01			
Vul	4.58±0.08	4.39±0.06	4.23±0.09			

^{A, B} ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของการทดลอง 2 ซ้ำ

^{a, b, c, d} ค่าที่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

Vp = *V. parahaemolyticus*, Sal = *Salmonella* sp., Stap = *S. aureus* และ Vul = *V. vulnificus*

4.5.2 การทำให้ *V. parahaemolyticus* สัมผัสกับอุณหภูมิแช่เย็นหรือแช่เยือกแข็งก่อนการเพาะเลี้ยง

อุณหภูมิเป็นปัจจัยด้านหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแปรรูปอาหารทะเล เริ่มตั้งแต่ขั้นตอนของการขนส่ง โดยจะต้องเก็บอาหารทะเลที่อุณหภูมิแช่เย็น (0 ถึง 4 องศาเซลเซียส) เพื่อรักษาคุณภาพความสด จากนั้นเมื่อเข้าสู่โรงงานจะเข้าสู่กระบวนการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น อาหารแช่เยือกแข็ง โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการแช่เยือกแข็งส่วนใหญ่จะอยู่ที่ -18 ถึง -20 องศาเซลเซียส การเก็บหรือแปรรูปอาหารทะเลที่อุณหภูมิดังกล่าวนั้น ทำให้ *V. parahaemolyticus* มีการสัมผัสกับอุณหภูมิ ซึ่งอาจทำให้เซลล์บาดเจ็บหรือตาย ดังนั้นเมื่อนำอาหารทะเลมาตรวจสอบหา *V. parahaemolyticus* โดยการนำเซลล์ที่ผ่านการสัมผัสกับอุณหภูมินั้นมาเพาะเลี้ยงในระบบที่ใช้ อาจทำให้มีสมบัติการเจริญและการสร้าง AHL ที่เปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นในการทดลองนี้จึงศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิแช่เย็นและอุณหภูมิแช่เยือกแข็งต่อสมบัติการเจริญและการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus* เปรียบเทียบกับระบบการเพาะเลี้ยงที่ไม่ได้ผ่านการสัมผัสกับความเย็น โดยทำการทดลองเก็บเชื้อภายใต้อุณหภูมิตั้งที่ 4 °C และอุณหภูมิตั้งที่ -20 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงใน peptone water (ร้อยละ 1) ที่มีเกลือร้อยละ 8 โดยให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 6logCFU/ml ตรวจสอบการเจริญและการสร้าง AHL โดยการติดตาม DT ร่วมกับการ spread plate ลงบน NA มีเกลือร้อยละ 3 ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus*

สภาวะ	จำนวนเซลล์ <i>V. parahaemolyticus</i> (logCFU/ml) ^A			ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร ^B		
	14 ชั่วโมง	16 ชั่วโมง	18 ชั่วโมง	14 ชั่วโมง	16 ชั่วโมง	18 ชั่วโมง
	อุณหภูมิห้อง	9.18 ^a ±0.02	9.22 ^a ±0.05	9.24 ^a ±0.06	0.117 ^a ±0.009	0.129 ^a ±0.003
4 °C	9.20 ^a ±0.06	9.22 ^a ±0.03	9.35 ^a ±0.05	0.118 ^a ±0.006	0.129 ^a ±0.001	0.135 ^a ±0.002
-20 °C	8.96 ^b ±0.06	9.07 ^b ±0.05	9.12 ^b ±0.05	0.093 ^b ±0.007	0.115 ^b ±0.007	0.134 ^a ±0.001

^{A, B} ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของการทดลอง 2 ซ้ำ

^{a, b} ค่าที่แสดงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากตารางที่ 4.8 พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยง *V. parahaemolyticus* ที่ไม่ได้ผ่านการสัมผัสกับความเย็น ด้วยระบบ selective pre-enrichment media โดยให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น $6\log\text{CFU/ml}$ ติดตามค่า DT ได้เท่ากับ 14 ชั่วโมง ซึ่งที่เวลานี้ *V. parahaemolyticus* เจริญจนมีจำนวนเซลล์ $9.18\log\text{CFU/ml}$ และสร้าง AHL ตรวจวัดได้ค่า OD_{520} เท่ากับ 0.108 และเมื่อเพาะเลี้ยง *V. parahaemolyticus* ที่สัมผัสกับอุณหภูมิแช่เย็น พบว่ายังคงเจริญและสร้าง AHL ที่ตรวจสอบได้ค่า DT เท่ากับ 14 ชั่วโมงเช่นเดิม โดยที่จำนวนเซลล์และค่า OD_{520} ที่ตรวจวัดได้ไม่แตกต่างกับระบบที่เชื้อไม่ผ่านการสัมผัสกับความเย็น กล่าวคือที่ค่า DT พบว่า *V. parahaemolyticus* เจริญจนมีจำนวนเซลล์ $9.20\log\text{CFU/ml}$ และสร้าง AHL ตรวจวัดได้ค่า OD_{520} เท่ากับ 0.114 ผลการทดลองนี้บ่งชี้ให้เห็นว่าการที่เซลล์ *V. parahaemolyticus* สัมผัสกับอุณหภูมิแช่เย็นก่อนการนำมาเพาะเลี้ยงต่อในระบบ selective pre-enrichment media นั้นไม่มีผลทำให้สมบัติการเจริญและการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus* เปลี่ยนแปลงไป แต่พบว่าหาก *V. parahaemolyticus* สัมผัสกับอุณหภูมิแช่เยือกแข็งก่อน เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงต่อใน peptone water ที่มีเกลือร้อยละ 8 พบว่าค่า DT จะยาวขึ้นเป็น 16 ชั่วโมง ซึ่งช้ากว่าในสภาวะปกติอยู่ 2 ชั่วโมง โดยมีจำนวนเซลล์ที่ชั่วโมงของ DT $9.04\log\text{CFU/ml}$ และปริมาณ AHL ตรวจวัดได้ค่า OD_{520} เท่ากับ 0.115 จากผลการทดลองบ่งชี้ให้เห็นว่าการสัมผัสกับอุณหภูมิแช่เยือกแข็งก่อนมีผลทำให้สมบัติการเจริญของ *V. parahaemolyticus* ในระบบ selective pre-enrichment media เปลี่ยนไป ทั้งนี้ส่งผลให้ค่า DT ยาวขึ้น 2 ชั่วโมง เนื่องมาจากการสัมผัสกับอุณหภูมิแช่เยือกแข็งจะทำให้เซลล์บาดเจ็บหรือตายจากการถูกทำลายด้วยผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นในระหว่างการแช่เยือกแข็งหรือจากผลึกของตัวถูกละลายที่เกิดขึ้นเนื่องจากสารละลายที่เข้มข้นขึ้นในระหว่างการแช่เยือกแข็ง (Moss และ Speck, 1966; Davies และ Obafemi, 1985; Chou และคณะ, 1999; Lin และคณะ, 2004 และ Shen, 2009) ทำให้เมื่อนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงต่อในระบบ selective pre-enrichment media เซลล์ที่บาดเจ็บจึงต้องใช้เวลาในการซ่อมแซมตัวเอง ทำให้เวลาที่เซลล์ใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ถึง $9\log\text{CFU/ml}$ และสร้าง AHL (OD_{520}) ให้ถึงระดับ DT ยาวขึ้นถึง 2 ชั่วโมง ดังนั้นสมการที่จะใช้ในการทำนายจำนวนเซลล์เริ่มต้นในระบบเซลล์ที่ผ่านการสัมผัสกับอุณหภูมิแช่แข็งจึงเป็น $y = -0.386x + 12.60$ เพื่อใช้ในการทำนายจำนวนเซลล์บาดเจ็บเริ่มต้น

4.5.3 อิทธิพลจากองค์ประกอบของอาหารทะเล

ในการตรวจสอบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลนั้น ประกอบไปด้วยขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างอาหารทะเลก่อนนำไปตรวจสอบ เช่นการตีปั่น หรือการบดตัวอย่างให้มีขนาดเล็กลง วิธีการเหล่านี้ทำให้มีชิ้นส่วนของอาหาร (food matrix) กระจายอยู่ใน

ระบบอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาจส่งผลต่อการตรวจวัดค่า AHL หรือสารอาหารจากตัวอย่างอาหารทะเลอาจส่งผลต่อการเจริญและการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus* ได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงศึกษาผลขององค์ประกอบของอาหารทะเลต่อการตรวจวัด AHL ด้วยวิธี colorimetry และผลต่อสมบัติการเจริญและการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus*

ในการตรวจสอบผลขององค์ประกอบของอาหารทะเลต่อการตรวจวัด AHL โดยการผสมน้ำปลาหมึกลงในอาหาร peptone water แล้วเติมสารมาตรฐาน AHL (ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.5.3) เมื่อนำอาหารมาตรวจวัด AHL ที่ OD₅₂₀ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.9 พบว่า ค่า OD₅₂₀ ที่ตรวจวัดได้ในอาหาร peptone water ที่เติม AHL เพียงอย่างเดียวมีค่าเท่ากับ 0.207 แต่เมื่อเติมน้ำปลาหมึกลงไป ค่า OD₅₂₀ จะสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (0.222) แสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบจากอาหารทะเลมีผลต่อการตรวจวัด AHL โดยพบว่ามีค่าความแตกต่างเท่ากับ 0.02 ทั้งนี้มีความเป็นไปได้ว่าสารอาหารที่เป็นองค์ประกอบในอาหารทะเล ซึ่งประกอบด้วย ไชมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต แร่ธาตุ และวิตามิน น่าจะสามารถทำปฏิกิริยากับ FeCl₃ ในระบบทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน Ferric(III)-hydroxamate ได้ มีผลให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น ซึ่งในปี 2001 Fazary และคณะ รายงานไว้ว่าสารประกอบพวกโปรตีนและกรดนิวคลีอิกสามารถเกิดปฏิกิริยา Hydroxamic acids ได้ เช่นเดียวกับ Yang และคณะ (2006) ซึ่งได้ศึกษาปฏิกิริยาของสารกลุ่ม AHL ต่อ FeCl₃ โดยการตรวจวัดความเข้มสีที่เกิดขึ้นโดย spectrophotometer ก็ได้รายงานไว้เช่นกันว่าสารประกอบที่มีหมู่ carboxylic, amine, hydroxyl และ acyl สามารถเกิดปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน Ferric hydroxamate ได้ ซึ่งทำให้เกิดความขุ่นและจะมีผลรบกวนต่อค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบสีที่เกิดขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อทดลองนำสารหลังทำปฏิกิริยามากรองด้วยตัวกรองขนาด 0.45 ไมครอน พบว่าค่า OD ที่ตรวจวัดได้จะมีค่าเท่ากับค่า OD ของระบบที่ไม่มีชิ้นส่วนของอาหาร ดังนั้น การเพิ่มขึ้นของค่า OD₅₂₀ ที่เกิดขึ้นจากชิ้นส่วนของอาหารทะเลนั้นจึงสามารถแก้ปัญหาได้โดยกรองคัลเจอร์ไว้เซลล์หลังทำปฏิกิริยากับ FeCl₃ ด้วยตัวกรองขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนที่นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer

ตารางที่ 4.9 ค่า OD₅₂₀ เมื่อมีอิทธิพลจากองค์ประกอบของอาหารทะเล

สภาวะ	OD ₅₂₀ ^A
peptone water+AHL	0.207 ^a ±0.002
peptone water +น้ำปลาหมึก+AHL	0.222 ^b ±0.004

^{A, B} ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของการทดลอง 3 ซ้ำ

^{a, b} ค่าที่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.10 อิทธิพลจากองค์ประกอบของอาหารทะเลต่อการเจริญและการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus*

สภาวะ	จำนวนเซลล์ <i>V. parahaemolyticus</i> (logCFU/ml) ^A			ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร ^B		
	22 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	26 ชั่วโมง	22 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	26 ชั่วโมง
ตัวอย่างควบคุม	9.16 ^a ±0.03	9.23 ^a ±0.07	9.27 ^a ±0.06	0.107 ^b ±0.002	0.124 ^b ±0.002	0.141 ^b ±0.003
น้ำปลาหมึก	9.15 ^a ±0.01	9.26 ^a ±0.04	9.31 ^a ±0.02	0.128 ^a ±0.001	0.142 ^a ±0.002	0.159 ^a ±0.001

^{A, B} ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของการทดลอง 2 ซ้ำ

^{a, b} ค่าที่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ส่วนการทดลองศึกษาผลขององค์ประกอบของอาหารทะเลต่อสมบัติการเจริญและการสร้าง AHL โดยการเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยง *V. parahaemolyticus* ในอาหาร selective pre-enrichment media ที่เติมและไม่เติมน้ำปลาหมึก (ตามวิธีการทดลองข้อ 3.5.3) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.10 พบว่าในระบบการเพาะเลี้ยงที่ไม่เติมน้ำปลาหมึก จะเจริญถึง 9.16logCFU/ml และสร้าง AHL ถึง OD₅₂₀ เท่ากับ 0.107 ที่เวลา 22 ชั่วโมง (DT เท่ากับ 22 ชั่วโมง) ในขณะที่ระบบที่มีน้ำปลาหมึกนั้น *V. parahaemolyticus* จะเจริญถึง 9.15logCFU/ml ที่ชั่วโมงที่ 22 เช่นเดียวกัน แต่จะสร้าง AHL ที่สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) คือ OD₅₂₀ เท่ากับ 0.128 ซึ่งแตกต่างจากที่ตรวจวัดได้ในระบบควบคุมเท่ากับ 0.02 สอดคล้องกับผลการทดลองข้างต้นซึ่งพบว่าองค์ประกอบในปลาหมึกมีผลให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงขึ้น 0.02 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า องค์ประกอบในปลาหมึกไม่มีอิทธิพลต่อการเจริญและการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus* อย่างไรก็ตาม ค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบสีที่เพิ่มขึ้นจากการรบกวนขององค์ประกอบของอาหารจากน้ำปลาหมึกนั้น เมื่อหักลบด้วยค่า 0.02 ก่อนจะยังคงใช้สมการ DT สมการเดิม ($y = -0.386x + 11.82$) ในการทำนายจำนวนเซลล์เริ่มต้นในช่วง 10 ถึง 10⁸ CFU/ml ได้ หรือสามารถใช้วิธีการกรองในการแก้ปัญหาดังกล่าวได้

จากการทดลองนี้ เนื่องจากใช้ปลาหมึกเป็นตัวแทนของอาหารทะเลเท่านั้น จึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่าอาหารทะเลทุกชนิดไม่มีอิทธิพลต่อการเจริญและการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus* อย่างไรก็ตามมีผู้ศึกษาอิทธิพลของสารอาหารจากอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ กุ้ง และผัก ต่อการสร้างสาร AHL ของแบคทีเรีย *Aeromonas* spp. พบว่าองค์ประกอบของสารอาหาร

จากอาหารทะเลที่นำมาทดสอบไม่มีอิทธิพลต่อการสร้างสัญญาณ AHL ของแบคทีเรียดังกล่าว (Medina-Martinez และคณะ, 2006) ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการทดลองนี้ได้ว่า สารอาหารจากอาหารทะเลไม่น่าจะมีอิทธิพลต่อการเจริญและการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus* ในระบบ selective pre-enrichment media นี้เช่นกัน

4.6 เปรียบเทียบการประมาณจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ด้วยการติดตามค่า DT กับวิธีมาตรฐาน MPN

4.6.1 ประเมินการตรวจสอบในระบบเชื้อบริสุทธิ์

การตรวจสอบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ในอาหารที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันนั้น มักนิยมใช้วิธีการวิเคราะห์ค่า MPN ซึ่งอ้างอิงตามมาตรฐานของ Bacteriological analytical manual online (BAM), USFDA, (May 2004) ดังนั้นการทดลองนี้จึงประเมินความถูกต้องของวิธี colorimetry ที่พัฒนาได้ในการประมาณจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ด้วยการติดตาม DT เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน MPN โดยเฉพาะเลี้ยง *V. parahaemolyticus* ในอาหาร NB ที่มีเกลือร้อยละ 3 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (overnight) ให้ได้จำนวนเซลล์ประมาณ $9\log\text{CFU/ml}$ จากนั้นเจือจางเป็นลำดับแล้วเปิดคัลเจอร์ลงใน selective pre-enrichment media (peptone water (ร้อยละ 1) ที่มีเกลือร้อยละ 8) ปริมาตร 99 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ $6\log, 5\log, 4\log, 3\log, 2\log$ และ $1\log\text{CFU/ml}$ ตรวจสอบการเจริญและการสร้าง AHL เพื่อการติดตามค่า DT และส่งตัวอย่างชุดเดียวกันไปวิเคราะห์ค่า Most Probable Number (MPN) (ภาคผนวก ข.1) ที่ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร โดยควบคุมเวลาเริ่มต้นการทดสอบที่เวลาเดียวกัน ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 การประมาณจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ในระบบเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี colorimetry และวิธีมาตรฐาน MPN

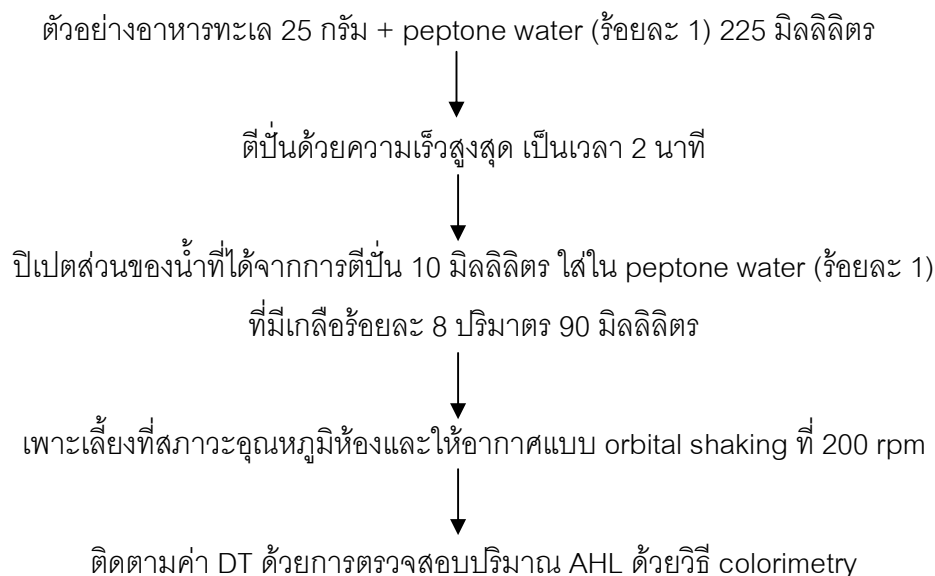
จำนวนเซลล์เริ่มต้น (logCFU/ml)	ตรวจทดสอบด้วยระบบ colorimetry		ตรวจทดสอบด้วยระบบ MPN	
	Detection time (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ที่ทำนาย ได้ (logCFU/ml)	MPN sequence	MPN index* per ml
1	26	1	3-3-3	> 1100
2	24	2	3-3-3	> 1100
3	20	3	3-3-3	> 1100
4	18	4	3-3-3	> 1100
5	16	5	3-3-3	> 1100
6	14	6	3-3-3	> 1100

* ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากตารางที่ 4.11 พบว่า ในระบบการเพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น 1log, 2log, 3log, 4log, 5log และ 6log CFU/ml เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี MPN พบว่าจำนวนเซลล์เริ่มต้นทุกระดับให้ค่า MPN sequence เท่ากับ 3-3-3 ซึ่งเมื่อแปลงเป็นค่า MPN index แล้วพบว่า ได้ค่ามากกว่า 1100 MPN/ml จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าวิธีมาตรฐาน MPN ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของจำนวนเซลล์ที่แตกต่างกันได้ ทั้งนี้เนื่องจากวิธี MPN เป็นวิธีที่ใช้ในการประมาณ (estimation) เท่านั้น มิใช่วิธีการนับ (enumeration) จำนวนเชื้อในอาหาร

ส่วนการประมาณจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ด้วยการติดตามค่า DT พบว่า ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น 1log, 2log, 3log, 4log, 5log และ 6log CFU/ml ติดตามค่า DT ได้เท่ากับ 26, 24, 20, 18, 16 และ 14 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งแปลงเป็นค่าทำนายจำนวนเซลล์เริ่มต้นด้วยสมการ $y = -0.386x + 11.82$ จะทำนายจำนวน *V. parahaemolyticus* ได้เท่ากับ 1log, 2log, 3log, 4log, 5log และ 6log CFU/ml แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาได้นี้สามารถใช้ในการประมาณจำนวนเซลล์เริ่มต้นในระบบเชื้อบริสุทธิ์ได้อย่างถูกต้อง ถึงแม้ว่าในระบบจะมี *V. parahaemolyticus* อยู่ 10 เซลล์ ก็สามารถตรวจทดสอบได้อย่างถูกต้อง ดังนั้นวิธีนี้จึงน่าจะมี

ประสิทธิภาพพอที่จะใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ในระบบอาหารต่อไปได้ โดยผลการวิจัยสามารถสรุปขั้นตอนการตรวจสอบได้ดังรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 สรุปขั้นตอนที่ใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเล

4.6.2 ประเมินการตรวจสอบในระบบอาหารทะเลสด

ในขั้นตอนนี้จะประเมินความถูกต้องของวิธี colorimetry ที่พัฒนาได้ในระบบอาหารทะเลสด ซึ่งมีวางขายในซูเปอร์มาเก็ตและตัวอย่างจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล (แสดงดังตารางที่ 3.3) โดยตรวจสอบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างด้วยวิธี colorimetry ที่พัฒนาได้ (ดังที่แสดงในข้อ 3.6.2) เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน MPN โดยส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ควบคุมเวลาเริ่มต้นการทดสอบที่เวลาเดียวกัน

จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.12 พบว่าปลาหมึกสดที่เติม *V. parahaemolyticus* จำนวนเซลล์ $2\log\text{CFU/ml}$ พบว่าติดตามค่า DT ได้เท่ากับ 24 ชั่วโมง ทำนายจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ที่ปนเปื้อนโดยคำนวณด้วยสมการ $y = -0.386x + 11.82$ ได้เท่ากับจำนวนที่เติมเริ่มต้นคือ $2\log\text{CFU/ml}$ ซึ่งที่ค่า DT ตรวจวัด AHL ได้ค่า OD_{520} เท่ากับ 0.115 เมื่อตรวจสอบขั้นยืนยันด้วยการเพาะเลี้ยง inoculums ลงบนอาหาร TCBS พบว่ามีโคโลนีของ *V. parahaemolyticus* ในจำนวนประมาณ $9.17\log\text{CFU/ml}$ และไม่พบโคโลนีของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ บน TCBS แต่เมื่อตรวจสอบด้วยอาหาร PCA จะพบโคโลนีของแบคทีเรียอื่นๆ ประมาณ $5.73\log\text{CFU/ml}$ แต่ทุกโคโลนีไม่มีคุณสมบัติในการสร้าง AHL (ตาราง 4.13) ส่วนในตัวอย่างกุ้ง

สดที่เติม *V. parahaemolyticus* จำนวนเซลล์ $6\log\text{CFU/ml}$ พบว่าติดตามค่า DT ได้เท่ากับ 14 ชั่วโมง ทำนายจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ที่ปนเปื้อนโดยคำนวณด้วยสมการ $y = -0.386x + 11.82$ ได้เท่ากับจำนวนเชื้อที่เติมคือ $6\log\text{CFU/ml}$ ซึ่งที่ค่า DT ตรวจวัด AHL ได้ค่า OD_{520} เท่ากับ 0.103 เมื่อตรวจสอบขั้นยืนยันด้วยการเพาะเลี้ยงลงบนอาหาร TCBS พบว่ามีโคโลนีของ *V. parahaemolyticus* ในจำนวนประมาณ $9.48\log\text{CFU/ml}$ และไม่พบโคโลนีของแบคทีเรียชนิดอื่นๆบน TCBS ส่วนโคโลนีบนอาหาร PCA มีประมาณ $8.52\log\text{CFU/ml}$ แต่ทุกโคโลนีไม่สร้าง AHL ผลการตรวจสอบด้วยวิธีมาตรฐาน MPN โดยพบว่าอาหารทะเลทั้ง 2 ตัวอย่างตรวจพบ *V. parahaemolyticus* ที่ค่า MPN sequence เท่ากับ 3-3-3 แปลเป็นค่า MPN index ได้เท่ากับ >1100 MPN ต่อกรัม

เมื่อนำวิธี colorimetry ที่พัฒนาได้มาทดลองใช้ตรวจสอบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างอาหารทะเลที่วางขายในซูเปอร์มาเก็ต และตัวอย่างจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลสดเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน MPN ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.12 พบว่า เมื่อตรวจสอบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างอาหารทะเลด้วยวิธี colorimetry โดยการติดตามค่า DT พบว่า เมื่อตรวจสอบค่า OD ที่ชั่วโมงที่ 26 ปริมาณ AHL ที่ตรวจวัดได้ในค่า OD_{520} อยู่ในช่วง 0.013–0.044 จึงทำนายจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ที่ปนเปื้อนได้ว่ามีจำนวนน้อยกว่า $1\log\text{CFU/ml}$ และเมื่อตรวจสอบยืนยันชนิดของจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่ใน inoculum โดยการ spread ลงบนอาหาร TCBS ผลปรากฏว่าไม่พบโคโลนีของ *V. parahaemolyticus* แต่พบโคโลนีของแบคทีเรียชนิดอื่นๆบนอาหาร TCBS และ PCA จำนวนหนึ่งและเมื่อนำไปทดสอบการสร้าง AHL พบว่าแบคทีเรียที่ปนเปื้อนเหล่านี้ไม่สร้างสาร AHL (แสดงรายละเอียดในตาราง 4.13) ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการตรวจสอบด้วยวิธีมาตรฐาน MPN ซึ่งพบว่า อาหารทะเลทุกๆตัวอย่างมีค่า MPN sequence เท่ากับ 0-0-0 แปลเป็นค่าประมาณจำนวนเซลล์จาก MPN index ได้ < 3.0 MPN ต่อกรัม เมื่อตรวจสอบขั้นยืนยันก็พบว่าไม่มีการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ด้วยเช่นกัน

ตารางที่ 4.12 การประมาณจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลสด ด้วยวิธีการติดตาม DT และวิธีมาตรฐาน MPN

ชนิดของอาหารทะเล	ตรวจสอบด้วยระบบ colorimetry			ตรวจสอบด้วยระบบ MPN			
	Detection time (ชั่วโมง)	จำนวน <i>V. parahaemolyticus</i> ที่ทำนายได้(CFU/ml)	ปริมาณ AHL ที่ตรวจวัดได้ (OD ₅₂₀)	Selective plating (TCBS & confirm test)	MPN sequence	MPN index* per g	Confirm test
1.ปลาหมึกสด+2logCFU/ml	24	10 ²	0.103±0.009	+	3-3-3	>1100	+
2.กุ้งสด+6logCFU/ml	14	10 ⁶	0.115±0.011	+	3-3-3	>1100	+
3.กุ้งสด	26	<10	0.038±0.006	ไม่พบ	0-0-0	<3.0	ไม่พบ
4.ปลาหมึกสด	26	<10	0.016±0.003	ไม่พบ	0-0-0	<3.0	ไม่พบ
5.หอยนางรม	26	<10	0.016±0.005	ไม่พบ	0-0-0	<3.0	ไม่พบ
6.กุ้งดิบปอกเปลือกแช่แข็งรับซื้อจาก supplier รอเข้ากระบวนการผลิต และไม่ต้องการล้างด้วยคลอรีน	26	<10	0.044±0.008	ไม่พบ	0-0-0	<3.0	ไม่พบ
7.กุ้งดิบที่ถูกล้างด้วยคลอรีน 50-100 ppm ปอกเปลือก แล้วนำมาผสมแป้งและเครื่องปรุง อัดขึ้นรูปเป็นแผ่น	26	<10	0.019±0.008	ไม่พบ	0-0-0	<3.0	ไม่พบ

ตารางที่ 4.12 การประมาณจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลสด ด้วยวิธีการติดตาม DT และวิธีมาตรฐาน MPN (ต่อ)

ชนิดของอาหารทะเล	ตรวจสอบด้วยระบบ colorimetry			ตรวจสอบด้วยระบบ MPN			
	Detection time (ชั่วโมง)	จำนวน <i>V. parahaemolyticus</i> ที่ทำนายได้(CFU/ml)	ปริมาณ AHL ที่ตรวจวัดได้ (OD ₅₂₀)	Selective plating (TCBS & confirm test)	MPN sequence	MPN index* per g	Confirm test
8. กุ้งดิบทั้งตัวที่ถูกล้างด้วยคลอรีน 50-100 ppm	26	<10	0.013±0.009	ไม่พบ	0-0-0	<3.0	ไม่พบ
9. กุ้งดิบทั้งตัวที่ถูกล้างด้วยคลอรีน 50-100 ppm แล้วนำมาปอกเปลือก	26	<10	0.003±0.006	ไม่พบ	0-0-0	<3.0	ไม่พบ
10. กุ้งดิบล้างด้วยคลอรีน 50-100 ppm ปอกเปลือกผสมแป้งและเครื่องปรุง อัดเป็นแผ่นแช่แข็ง -18 °C	26	<10	0.022±0.004	ไม่พบ	0-0-0	<3.0	ไม่พบ
11. กุ้งดิบล้างด้วยคลอรีน 50-100 ppm ปอกเปลือก นำมาผสมแป้งและเครื่องปรุง อัดขึ้นรูปเป็นแผ่นแช่แข็ง -18 °C	26	<10	0.016±0.004	ไม่พบ	0-0-0	<3.0	ไม่พบ

ตารางที่ 4.12 การประมาณจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลสด ด้วยวิธีการติดตาม DT และวิธีมาตรฐาน MPN (ต่อ)

ชนิดของอาหารทะเล	ตรวจสอบด้วยระบบ colorimetry				ตรวจสอบด้วยระบบ MPN		
	Detection time (ชั่วโมง)	จำนวน <i>V. parahaemolyticus</i> ที่ทำนายได้(CFU/ml)	ปริมาณ AHL ที่ตรวจวัดได้ (OD ₅₂₀)	Selective plating (TCBS & confirm test)	MPN sequence	MPN index* per g	Confirm test
12. กุ้งดิบที่ถูกล้างด้วยคลอรีน 50-100 ppm ปอกเปลือก นำมาผสมแป้งและเครื่องปรุง อัดขึ้นรูปเป็นแผ่นแช่แข็ง -18 °C ชุบแป้งและเกล็ดขนมปัง แล้วแช่แข็ง -18 °C อีกครั้ง	26	<10	0.015±0.005	ไม่พบ	0-0-0	<3.0	ไม่พบ
13. กุ้งดิบที่ถูกล้างด้วยคลอรีน 50-100 ppm ปอกเปลือก นำมาผสมแป้งและเครื่องปรุง อัดขึ้นรูปเป็นแผ่นแช่แข็ง -18 °C ชุบแป้งและเกล็ดขนมปัง แล้วแช่แข็ง -18 °C อีกครั้ง	26	<10	0.024±0.003	ไม่พบ	0-0-0	<3.0	ไม่พบ

ตารางที่ 4.12 การประมาณจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลสด ด้วยวิธีการติดตาม DT และวิธีมาตรฐาน MPN (ต่อ)

ชนิดของอาหารทะเล	ตรวจสอบด้วยระบบ colorimetry			ตรวจสอบด้วยระบบ MPN			
	Detection time (ชั่วโมง)	จำนวน <i>V. parahaemolyticus</i> ที่ทำนายได้(CFU/ml)	ปริมาณ AHL ที่ตรวจวัดได้ (OD ₅₂₀)	Selective plating (TCBS & confirm test)	MPN sequence	MPN index* per g	Confirm test
14. กุ้งดิบทั้งตัวที่ถูกล้างด้วยคลอรีน 50-100 ppm	26	<10	0.028±0.004	ไม่พบ	0-0-0	<3.0	ไม่พบ

* ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

+ หมายถึง เมื่อตรวจสอบสมบัติทางชีวเคมี, การเจริญในน้ำเกลือความเข้มข้นต่างๆแล้ว แสดงคุณสมบัติของ *V. parahaemolyticus*

ตารางที่ 4.13 ผลการตรวจสอบจำนวนเซลล์และ % การสร้าง AHL ของแบคทีเรียที่ตรวจพบในตัวอย่างอาหารทะเลทั้ง 14 ชนิด

ตัวอย่างอาหารทะเล	อาหาร PCA			อาหาร TCBS		
	จำนวนเซลล์ที่ตรวจพบ	%AHL positive*	%AHL negative**	จำนวนเซลล์ที่ตรวจพบ	%AHL positive*	%AHL negative**
1	5.73±0.06	0	100	9.17±0.08	100	0
2	8.52±0.06	0	100	9.48±0.05	100	0
3	8.77±0.02	0	100	5.90±0.05	0	100
4	8.96±0.04	0	100	7.39±0.04	0	100
5	7.65±0.05	0	100	3.41±0.02	0	100
6	9.02±0.06	0	100	7.14±0.02	0	100
7	4.65±0.10	0	100	4.20±0.05	0	100
8	7.76±0.05	0	100	5.65±0.07	0	100
9	7.91±0.06	0	100	4.00±0.08	0	100
10	6.83±0.10	0	100	4.05±0.10	0	100
11	8.32±0.03	0	100	6.44±0.01	0	100
12	5.73±0.05	0	100	3.40±0.09	0	100
13	5.90±0.06	0	100	4.19±0.04	0	100
14	7.92±0.10	0	100	5.78±0.08	0	100

* ร้อยละของโคโลนีที่สร้าง AHL

** ร้อยละของโคโลนีที่ไม่สร้าง AHL

จากผลการทดลองเหล่านี้ แสดงให้เห็นว่าวิธี colorimetry เป็นวิธีที่มีศักยภาพที่จะนำไปใช้ เป็นวิธีทางเลือกสำหรับตรวจสอบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลได้ แต่ทั้งนี้ ควรทดสอบประสิทธิภาพของวิธี โดยการตรวจสอบในอาหารทะเลที่หลากหลายมากขึ้น และศึกษา เพิ่มเติมในเรื่องของความหลากหลายของสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* และจุลินทรีย์อื่นๆ ในระบบนิเวศของอาหารทะเล อีกทั้งต้องทำการประเมินประสิทธิภาพของวิธีโดยการตรวจสอบ ความถูกต้องโดยสมบูรณ์ (full validation)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

ในการทดลองประเมินหาสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับสารมาตรฐาน AHL สำหรับพัฒนาเป็นวิธีทาง colorimetry พบว่าการใช้ ferric chloride ตามวิธีที่พัฒนาโดยรัชนีดา, 2550 เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากให้ผลิตภัณฑ์สารประกอบสีที่เด่นชัดและเสถียรที่สุด จึงเลือกเป็นวิธีทาง colorimetry สำหรับใช้ตรวจวัด AHL ที่สร้างจาก *V. parahaemolyticus*

จากผลการทดลองการตรวจยืนยันการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus* ด้วย HPLC บ่งชี้ได้ว่า เชื้อชนิดนี้มีคุณสมบัติในการสร้าง AHL ชนิด 3-hydroxyl-C4-HSL ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน Ferric(III)-hydroxamate เกิดเป็นสารประกอบสีที่ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และจากผลการประเมินการตรวจสอบสาร AHL ในคัลเจอร์ของ *V. parahaemolyticus* ด้วยวิธี colorimetry พบว่า สารประกอบสีที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นอย่างจำเพาะระหว่าง AHL กับ $FeCl_3$ และมีสมบัติการดูดกลืนแสงที่มี $\lambda_{max} \sim 520$ นาโนเมตร และองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตลอดจนเมตาบอไลต์อื่นๆที่เชื้อสร้างขึ้นไม่รบกวนปฏิกิริยาดังกล่าว

เมื่อประเมินสมบัติการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus* ภายใต้สภาวะที่มีเกลือ พบว่าปริมาณ AHL ที่ตรวจวัดได้แปรผันตามจำนวนเซลล์ โดยในทุกๆความเข้มข้นเกลือ เมื่อเชื้อเจริญถึงจำนวนเซลล์ประมาณ $9 \log CFU/ml$ ค่า AHL ที่ตรวจวัดได้จะมีค่าเท่ากับ 0.1 (OD_{520}) เสมอ และเลือก peptone water (ร้อยละ 1) ที่มีเกลือร้อยละ 8 เป็น selective pre-enrichment media สำหรับเพาะเลี้ยง *V. parahaemolyticus* ให้สร้าง AHL โดยพบว่าจำนวนเซลล์ในช่วงตั้งแต่ $8.8 \log CFU/ml$ ขึ้นไป กับปริมาณ AHL ในช่วงที่ตรวจวัดได้ $OD_{520} \geq 0.02$ ขึ้นไป มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ดังนั้นจึงสามารถใช้ปริมาณ AHL ในการทำนายจำนวนเซลล์เริ่มต้นในระบบ selective pre-enrichment media ได้ โดยอาศัย detection time (DT) ซึ่งหมายถึง เวลาที่เชื้อใช้ในการเจริญจากเซลล์เริ่มต้นจนได้จำนวนเซลล์ประมาณ $9 \log CFU/ml$ ซึ่งตรวจวัด AHL ได้ที่ OD_{520} โดยในระบบ pure culture เมื่อมีจำนวนเซลล์เริ่มต้น $10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7$ และ 10^8 CFU/ml จะมีค่า DT เท่ากับ 26, 24, 22, 20, 16, 14, 12 และ 10 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยที่จำนวนเซลล์เริ่มต้นและค่า DT มีความสัมพันธ์กันแบบเส้นตรง ($y = -0.386x + 11.82$) มีค่า r^2 เท่ากับ 0.99 ซึ่งจะใช้เป็นสมการสำหรับการทำนายจำนวนเซลล์เริ่มต้นของ *V. parahaemolyticus* ในช่วง 10 ถึง 10^8 CFU/ml ได้

เมื่อตรวจสอบปัจจัยต่างๆที่อาจมีอิทธิพลต่ออัตราการเจริญและการสร้าง AHL ของ *V. parahaemolyticus* ได้แก่ การมีอันตรกิริยากับจุลินทรีย์ชนิดอื่น การสัมผัสกับอุณหภูมิแช่เย็นหรือแช่เยือกแข็งก่อนการเพาะเลี้ยง และอิทธิพลจากองค์ประกอบของอาหารทะเล พบว่าการมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นอยู่ในระบบทำให้ *V. parahaemolyticus* เจริญลดลง และเหนี่ยวนำการสร้าง AHL ให้สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แต่ปริมาณ AHL ที่เพิ่มขึ้นไม่ได้สูงพอที่จะทำให้ค่า DT เปลี่ยนแปลงไป ส่วนผลของการสัมผัสกับอุณหภูมิต่างๆก่อนการเพาะเลี้ยง พบว่าการสัมผัสกับอุณหภูมิแช่เย็นไม่มีอิทธิพลต่อการเจริญและการสร้าง AHL แต่การที่เชื้อสัมผัสกับอุณหภูมิแช่เยือกแข็ง มีผลให้เชื้อมีการเจริญช้าลง ทำให้ค่า DT ยาวขึ้น 2 ชั่วโมง ดังนั้นสมการที่จะใช้ในการทำนายจำนวนเซลล์เริ่มต้นในระบบเซลล์ที่ผ่านการสัมผัสกับอุณหภูมิแช่แข็งจึงเป็น $y = -0.386x + 12.60$ เมื่อตรวจสอบอิทธิพลจากองค์ประกอบของอาหารทะเล พบว่าองค์ประกอบของอาหารทะเลไม่มีผลต่อการเจริญและการสร้าง AHL ของเชื้อ แต่มีผลทำให้ค่า OD ของสารประกอบสีที่เกิดขึ้นเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งเมื่อหาค่า OD ที่ตรวจวัดได้ด้วยค่า 0.02 แล้วก็จะยังคงใช้สมการ DT สมการเดิมในการทำนายจำนวนเซลล์เริ่มต้นได้

ในการทดลองสุดท้าย เป็นการนำวิธีที่พัฒนาได้ไปทดลองใช้ประมาณจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างอาหารทะเลด้วยการติดตามค่า DT เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน MPN พบว่าผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกัน แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาได้นี้มีประสิทธิภาพจึงสรุปเป็นขั้นตอนในการตรวจสอบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลได้ดังรูปที่ 4.16 โดยในการประยุกต์ใช้มีแนวทางดังนี้ ถ้าต้องการตรวจสอบตามมาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ คือ พบได้ไม่เกิน 200 CFU/g ทำได้โดยสุ่มตัวอย่างมาตรวจสอบปริมาณ AHL ที่เวลา 24 ชั่วโมง หากค่า OD₅₂₀ ต่ำกว่า 0.1 รายงานผลได้ว่าการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเล <100 CFU/g แต่หากต้องการทราบปริมาณเซลล์ที่ปนเปื้อนสามารถทำได้โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 2 ชั่วโมง ตั้งแต่ที่เวลา 10 ชั่วโมง ไปจนถึง 26 ชั่วโมง โดยที่เวลาที่ตรวจวัด AHL ได้ค่า OD₅₂₀ เท่ากับ 0.1 จะถือเป็นค่า DT จากนั้นนำค่า DT ที่ได้ไปแทนในสมการ DT เพื่อคำนวณเป็นจำนวนเซลล์ที่ปนเปื้อนมาในตัวอย่างอาหารทะเลนั้น

5.2 ข้อเสนอแนะ

วิธีที่พัฒนาได้นี้มีข้อได้เปรียบกว่าวิธีมาตรฐาน MPN คือสามารถบ่งชี้เป็นจำนวนเซลล์ได้ โดยถ้าผลการตรวจสอบบ่งชี้ว่า ตรวจไม่พบ AHL (OD₅₂₀ < 0.02) ที่เวลา 26 ชั่วโมง แสดงว่ามีการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* น้อยกว่า 10 CFU/ml แต่ถ้าตรวจพบการสร้าง AHL แสดงว่ามีโอกาสที่จะพบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างอาหารทะเลนั้น ทำให้สามารถ

บอกระดับความรุนแรงของการปนเปื้อนได้ อีกทั้งยังใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบที่สั้นกว่าวิธีมาตรฐาน MPN แต่อย่างไรก็ตามก่อนที่จะนำวิธีที่พัฒนาได้นี้ไปใช้จริงในโรงงานอุตสาหกรรมหรือในเชิงการค้าควรทำการประเมินประสิทธิภาพของวิธีโดยการตรวจสอบความถูกต้องโดยสมบูรณ์ (full validation) ตลอดจนศึกษาปัจจัยที่อาจมีผลต่อความถูกต้องของวิธี เช่น ศึกษาถึงความหลากหลายของสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* และจุลินทรีย์อื่นๆในระบบนิเวศของอาหารทะเล

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- สำนักกระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. 2549. สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค 2549.
- รัชธิดา เดชอุดม. 2550. การพัฒนาวิธีการตรวจจุลินทรีย์ก่อโรค *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* โดยการใช้วิธีทดสอบด้วยแอนติบอดีแบบอิมมูโนเซนซิง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารธุรกิจ. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

- Anderson, J.B., Heydorn, A., Hentzer, M., Eberl, L., Geisenberger, O., Christensen, B.B., Molin, S. and Givskov, M., 2001. *gfp*-Based N-acyl homoserine lactone sensor system for detection of bacterial communication. Applied Environmental Microbiology. 67 : 575– 585.
- Atkinson, S., Throup, J.P., Stewart, G.S.A.B., and Williams, P. 1999. A hierarchical quorum-sensing system in *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in the regulation of motility and clumping. Molecular Microbiology. 33 : 1267– 1277.
- Bainton, N. J., Stead, P., Chhabra, S. R., Bycroft, B. W., Salmond, G. P. C., Stewart, G. S. A. B. and Williams, P. 1992. *N*-(3-Oxohexanoyl)-L-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora*. Biochemical Journal. 288 : 997–1004.
- Banerjee, S.K., Pandian, S., Todd, E.C. and Farber, J.M. 2002. A rapid and improved method for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* strains grown on hydrophobic grid membrane filters. Journal of Food Protection. 65 : 1049–1053.
- Bassler, B.L., 2002. Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. Cell. 109 : 421– 424.
- Bassler, B.L., Greenberg, E.P., and Stevens, A.M. 1997. Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. Journal of Bacteriology. 179(12) : 4043–4045.

- Bassler, B.L., Wright, M., Showalter, R.E., and Silverman, M.R. 1993. Intracellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. Molecular Microbiology. 9 : 773–786.
- Bej, A.K., Patterson, D.P., Brasher, C.W., Vickery, M.C.L., Jones, D.D. and Kaysner, C.A. 1999. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tdl*, *tdh*, and *trh*. Journal of Microbiological Methods. 36 : 215–225.
- Bhuiyan, N.A., Ansaruzzaman, M., Kamruzzaman, M., Khorshed Alam, Chowdhury, N.R. and Nishibuchi, M. 2002. Prevalence of the pandemic genotype of *Vibrio parahaemolyticus* in Dhaka, Bangladesh, and Significance of its distribution across different serotypes. Journal of Clinical Microbiology. 40(1) : 284-286.
- Blosser-Middleton, R.S. and Gray, K.M. 2001. Multiple N-acyl homoserine lactone signals of *Rhizobium leguminosarum* are synthesized in a distinct temporal pattern. Journal of Bacteriology. 183 : 6771–6777.
- Bruhn, J.B., Christensen, A.B., Flodgaard, L.R., Nielsen, K.F., Larsen, T.O., Givskov, M. and Gram, L. 2004. Presence of acylated homoserine lactone (AHLs) and AHL-producing bacteria in meat and potential role of AHL in spoilage of meat. Applied and Environmental Microbiology. 70(7) : 4293-4302.
- Buchholtz, C., Neilsen, K.F., Milton, D.L., Larsen, J.L. and Gram, L. 2005. Profiling of acylated homoserine of *Vibrio anguillarum* in vitro and in vivo: Influence of growth condition and serotype. Systematic and Applied Microbiology. 29(6) : 433–445.
- Byers, J.T., Lucas, C., Salmond, G.P.C., Welch, M. 2002. Nonenzymatic turnover of an *Erwinia carotovora* quorum-sensing signaling molecule. Journal of Bacteriology. 184 : 1163–1171.
- Cámara, M., Hardman, A., Williams, P. and Milton, D. 2002. Quorum sensing in *Vibrio cholera*. Nature Genetics. 32 : 217–218.
- Chambers, C.E., Visser, M.B., Schwab, U. and Sokol, P.A. 2005. Identification of N-acylhomoserine lactones in mucopurulent respiratory secretions from cystic fibrosis patients. FEMS Microbiology Letters. 244 : 297–304.

- Chernin, L.S., Winson, M.K., Thompson, J.M., Haran S. and Bycroft B.W. 1998. Chitinolytic activity in *Chromobacterium violaceum*: substrate analysis and regulation by quorum sensing. Journal of Bacteriology. 180 : 4435–41.
- Chhabra, S. R., Stead, P., Bainton, N. J., Salmond, G. P. C., Stewart, G. S. A. B., Williams, P., and Bycroft, B. W. 1993. Autoregulation of carbapenem biosynthesis in *Erwinia carotovora* by analogues of *N*-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone. The Journal of Antibiotics. 46 : 441–454.
- Chou, C.C., Cheng, S.J., Wang, Y.C. and Chung, K.T. 1999. Behavior of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in tryptic soy broth subjected to various low temperature treatments. Food Research International. 32 : 1–6.
- Colwell, R.R. 2004. Infectious disease and environment: cholera as a paradigm for waterborne disease. International Microbiology. 7 : 285–289.
- Cubo, M.T., Economou, A., Murphy, G., Johnston, A.W., and Downie, J.A. 1992. Molecular characterization and regulation of the rhizosphere-expressed genes *rhi- ABCR* that can influence nodulation by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. Journal of Bacteriology. 174 : 4026–35.
- Davies, R. and Obafemi, A. 1985. Response and micro-organism to freeze –thaw stress. In: Robinson, R.K. (Ed.), *Microbiology of Frozen Foods*. Elsevier, London: 83–107.
- Derzelle, S., Duchaud, E., Kunst, F., Danchin, A. and Bertin, P. 2002. Identification, characterization, and regulation of a cluster of genes involved in carbapenem biosynthesis in *Photobacterium luminescens*. Applied and Environmental Microbiology. 68 : 3780–3789.
- Dickinson, B.L. and Lencer, W.I. 2003. Transcytosis of bacterial toxins across mucosal barriers. ASM Press. 178–186.
- Dow, J.M., Crossman, L., Findlay, K., He, Y.Q., Feng, J.X. and Tang, J.L. 2003. Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell–cell signalling and is required for full virulence to plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 100 : 10995–11000.

- Duan, J. and Su, Y.C. 2005. Comparison of a chromogenic medium with thiosulfate–citrate–bile salts–sucrose agar for detecting *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Food Science. 70:125–128.
- Eberl, L., Winson, M.K., Sternberg, C., Stewart, G.S.A.B., Christiansen, G., Chhabra, S.R., Bycroft, B.W., Williams, P., Molin, S., and Givskov, M., 1996. Involvement of *N*-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behavior of *Serratia liquefaciens*. Molecular Microbiology. 20 : 127–136.
- Englmann, M., Fekete, A., Kuttler, C., Frommberger, M., Li, X., Gebefugi, I., Fekete, J. and Schmitt-Kopplin, P. 2007. The hydrolysis of unsubstituted *N*-acylhomoserine lactones to their homoserine metabolites Analytical approaches using ultra performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A. 1160 : 184–193.
- Fazary, A.E., Khalil, M.M., Fahmy, A. and Tantawy, T.A. 2001. The role of hydroxamic acids in biochemical processes. Medical Journal of Islamic Academy of Sciences. 14(3) : 109–116.
- Flodgaard, L.R., Christensen, A.B., Molin, S., Givskov, M. and Gram, L. 2003. Influence of food preservation parameters and associated microbiota on production rate, profile and stability of acylated homoserine lactones from food-derived *Enterobacteriaceae*. International Journal of Food Microbiology 84 : 145– 156.
- Freeman, J.A., Bassler, B.L., 1999. Sequence and function of LuxU: a two-component phosphorelay protein that regulates quorum sensing in *Vibrio harveyi*. Journal of Bacteriology. 181 : 899–906.
- Frommberger, M., Kopplin, P.S., Ping, G., Frisch, H., Schmid, M., Zhang, Y., Hartmann, A. and Kettrup, A. 2004. A simple and robust set-up for on-column sample preconcentration- nano-liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for the analysis of *N*-acylhomoserine lactones. Analytical and bioanalytical chemistry. 378 : 1014-1020.
- Fujino, T., Okuno, Y., Nakada, D., Aoyama, A., Fukai, K., T. Mukai and T. Ueho. 1953. On the bacteriological examination of shirasu food poisoning. Medical Journal Osaka University. 4 : 299–304.

- Fuqua, C. and Greenberg, E. P. 2002. Listening in on bacteria: acyl homoserine lactone signalling. Nature. 3(9) : 685–695.
- Fuqua, C., Winans, S.C., and Greenberg, E.P. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density responsive transcriptional regulators. Journal of Bacteriology.176 : 269–275.
- Geisenberger, Givskov, O., Riedel, M., Hoiby, K., Tummler, N., and Eberl, B. L. 2000. Production of N-acyl-L-homoserine lactones by *P.aeruginosa* isolates from chronic lung infections associated with cystic fibrosis. FEMS Microbiology Letters. 184 : 273–278.
- Glagovich. Organic qualitative analysis outline. [online]. Available from : <http://www.Chemistry.ccsu.edu/glagovich/teching/316/qualanal/test/hydroxamic.html>. [2009, May 23].
- Gobbetti, M., Angelis, M., Cagno, R., Minervini, F. and Limitone, A. 2007. Cell–cell communication in food related bacteria. International Journal of Food Microbiology. 120 : 34–45.
- Goddu, R.F., Leblanc, N.F. and Wright, C.M. 1955. Spectrophotometric determination of esters and anhydrides by hydroxamic acid reaction, Analytical Chemistry. 27 : 1251–1255.
- Gooch, J.A., DePaola, A., Kaysner, C.A. and Marshall, D.L. 2001. Evaluation of two direct plating methods using nonradioactive probes for enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters. Applied Environmental Microbiology. 67 : 721–724.
- Gram, L., Christensen, L.B., Ravn, L., Molin, S., and Givskov, M. 1999. Production of acylated homoserine lactones by psychrotrophic members of the *Enterobacteriaceae* isolated from foods. Applied and Environmental Microbiology. 65(8) : 3458–3463.
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J.B., Christensen, A.B. and Givskov, M. 2002. Food spoilage-interaction between food spoilage bacteria. International Journal of Food Microbiology. 78 : 79–97.
- Greenberg, E. P., Hastings, J. W., and Ulitzer, S. 1979. Induction of luciferase synthesis in *Beneckea harveyi* by other marine bacteria. Archives of Microbiology. 120 : 87–91.

- Hauge, H.H., Mantzilas, D., Moll, G.N., Konings, N.W., Driesse, A.J.M., Eijsink, V.G.H. and Nissen-Meyer, J. 1998. Plantaricin A is an amphiphilic α -helical bacteriocin-like pheromone which exerts antimicrobial and pheromone activities through different mechanisms. Biochemistry. 37 : 16026–16032.
- Huang, Y.L., Dobretsov, S., Ki, J.S., Yang, L.H. and Qian, P.Y. 2007. Presence of acyl-homoserine lactone in subtidal biofilm and the implication in larval behavioral response in the polychaete *Hydroides elegans*. Microbial Ecology. 54 : 384–392.
- Henke, J.M., and Bassler, B.L. 2004. Quorum sensing regulates type III secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Bacteriology. 186 : 3794–3805.
- Jacobi, C.A., Bach, A., Eberl, L., Steidle, A. and Heesemann, J. 2003. Detection of N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone in mice infected with *Yersinia enterocolitica* serotype O8. Infection and Immunity. 71(11) : 6624–6626.
- Jafrá, S., and Wolf, J.M. 2004. Fast screening method for detection of acyl-HSL-degrading soil isolates. Journal of Microbiological Methods. 57 : 415–420.
- Jones, S., Yu, B., Bainton, N.J., Birdsall, M., and Bycroft, B.W. 1993. The *lux* autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. EMBO Journal. 12 : 2477–82.
- Kaper, J.B., Fasano, A. and Trucksis, M. 1994. Toxins of *Vibrio cholerae*. ASM Press. 145–176.
- Kaufman, G.E., Bowen, M.D., Meyer, R.F., DePaola, A., Bowers, J., Blackstone, G.M., Vickery, M.C.L. and Bej, A.K., 2004. Real-time PCR quantification of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters using an alternative matrix. Journal of Food Protection. 67:2424–2429.
- Kim, S.Y., Lee, S.E., Kim, Y.R., Kim, C.M., Ryu, P.Y., Choy, H.E., Chung, S.S. and Rhee, J.H. 2003. Regulation of *Vibrio vulnificus* virulence by the LuxS quorum-sensing system. Molecular Microbiology. 48 :1647–1664.
- Kuo, A., Callahan, N. S. M. and Dunlap, P. V. 1996. Modulation of luminescence operon expression by *N*-octanoyl-L-homoserine lactone in *ainS* mutants of *Vibrio fischeri*. Journal of Bacteriology. 178 : 971–976.

- Lake, R., Hudson, A. and Cressey, P. Risk profile: *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. Institute of Environmental Science and Research Limited. [online]. 2003. Available from : [http:// www.esr.cri.nz](http://www.esr.cri.nz). [2009, January 18].
- Latifi, A., M. Winson, K., Foglino, M., Bycroft, B. W., Stewart, G. S. A. B., Lazdunski, L., and Williams, P. 1995. Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Molecular Microbiology. 17 : 333–343.
- Leitao, J.M.M. and Esteves da Silva, J.G.C. 2008. Factorial analysis optimization of a diltiazem kinetic spectrophotometric quantification method. Analytica Chimica Acta. 609 : 1-12.
- Lenz, D.H., Mok, K.C., Lilley, B.N., Kulkarni, R.V., Wingreen, N.S. and Bassler, B.L. 2004. The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. Cell. 118 : 69–82.
- Lewenza, S., Conway, B., Greenberg, E. P., and Sokol, P. A. 1999. Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. Journal of Bacteriology. 181:748–756.
- Lilly, B.N. and Bassler, B.L. 2000. Regulation of quorum sensing in *Vibrio harveyi* by LuxO and sigma-54. Molecular Microbiology. 36 : 940–954.
- Lin, C., Yu, R.C. and Chou, C.C. 2004. Susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* to various environmental stresses after cold shock treatment. International Journal of Food Microbiology. 92 : 207– 215.
- Lithgow, J.K., Danino, V.E., Jones, J. and Downie, J.A. 2001. Analysis of N-acyl homoserine-lactone quorum-sensing molecules made by different strains and biovars of *Rhizobium leguminosarum* containing different symbiotic plasmids. Plant and Soil. 232 : 3– 12.
- Liu, P.C., and Lee, K.K. 1999. Cysteine protease is a major exotoxin of pathogenic luminous *Vibrio harveyi* in the tiger prawn, *Penaeus monodon*. Letters in Applied Microbiology. 28 : 428–430.
- Lupp, C. and Ruby, E.G. 2004. *Vibrio fischeri* LuxS and AinS: comparative study of two signal synthases. Journal of Bacteriology. 186 : 3873–3881.

- March, J.C. and Bentley, W.E. 2004. Quorum sensing and bacterial cross-talk in biotechnology. Current Opinion in Biotechnology. 15 : 495–502.
- Medina-Martinez, M.S., Uyttendaele, M., Demolder, V. and Debevere, J. 2006. Influence of food system conditions on *N*-acyl-L-homoserine lactones production by *Aeromonas* spp. International Journal of Food Microbiology. 112 : 244–252.
- Martinez, M.S., Uyttendaele, M., Demolder, V., and Debevere, J. 2005. Effect of temperature and glucose concentration on the *N*-butanoyl-L-homoserine lactone production by *Aeromonas hydrophila*. Food Microbiology. 23 (6) : 534-540.
- Matsumoto, C., Okuda, J., Ishibashi, M., Iwanaga, M., Garg, P., Rammamurthy, T., Wong, H.C., DePaola, A., Kim, Y.B., Albert, M.J. and Nishibuchi, M. 2000. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and *toxRS* sequence analyses. Journal of clinical Microbiology. 38 : 578–585.
- McCarthy, S.A., DePaola, A., Cook, D.W., Kaysner, C.A. and Hill, W.E. 1999. Evaluation of alkaline phosphatase- and digoxigenin-labeled probes for detection of the thermolabile hemolysin (*tlh*) gene of *Vibrio parahaemolyticus*. Letter of Applied Microbiology. 28 : 66–70.
- McDougald, D., Rice, S.A. and Kjelleberg, S. 2001. SmcR dependent regulation of adaptive phenotypes in *Vibrio vulnificus*. Journal of Bacteriology. 183 : 758–762.
- Middleton, B., Rodgers, H.C., Camara, M., Knox, A.J., Williams, P. and Hardman, A. 2002. Direct detection of Nacylhomoserine lactones in cystic fibrosis sputum. FEMS Microbiological Letter. 207 : 1–7.
- Miller, M.B. and Bassler, B.L. 2001. Quorum sensing in bacteria. Annual Review of Microbiology. 55 : 165–199.
- Miller, M.B., Skorupski, K., Lenz, D.H., Taylor, R.K. and Bassler, B.L. 2002. Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. Cell. 110 : 303–314.
- Milton, D.L. 2006. Quorum sensing in vibrios: Complexity for diversification. International Journal of Medical Microbiology. 296 : 61–71.

- Mok, K.C., Wingreen, N.S., and Bassler, B.L. 2003. *Vibrio harveyi* quorum sensing: a coincidence detector for two autoinducers controls gene expression. EMBO Journal. 22 : 870–881.
- Morin, D., Grasland, B., Vallee-Rehel, K., Dufau, C. and Haras, D. 2003. On-line high-performance liquid chromatography-mass spectrometric detection and quantification of *N*-acylhomoserine lactones, quorum sensing signal molecules, in the presence of biological matrices. Journal of Chromatography A. 1002 : 79-92.
- Moss, C.W. and Speck, M.L., 1966. Injury and death of *Streptococcus lactis* due to freezing and frozen storage. Applied Microbiology. 11 : 326– 329.
- Nasser, W., Bouillant, M.L., Salmond, G., and Reverchon, S. 1998. Characterization of the *Erwinia chrysanthemi* *explexpR* locus directing the synthesis of two *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules. Molecular Microbiology. 29 : 1391–405.
- Naughton, L.M., Blumerman, S.L., Carlberg, M. and Boyd, E.F. 2009. Osmoadaptation among *Vibrio* Species and Unique Genomic Features and Physiological Responses of *Vibrio parahaemolyticus*. Applied and Environmental Microbiology. 75 : 2802–2810.
- Pearson, J. P., Gray, K. M., Passador, L., Tucker, K. D., Eberhard, A., Iglewski, B. H., and Greenberg, E. P. 1994. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 91 : 197–201.
- Pearson, J.P., Passador, L., Iglewski, B.H., and Greenberg, E.P. 1995. A second *N*- acyl homoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 92 : 1490–94.
- Perego, M. and Hoch, J.A. 1996. Cell–cell communication regulates the effects of protein aspartate phosphatases on the phosphorelay controlling development in *Bacillus subtilis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 93 : 1549–1553.
- Pillai, S.D. and Jesudhasen, P.R. 2006. Quorum sensing: How bacteria communicate. Food Technology. 04 : 42–50.

- Piper, KR., Beck von Bodman, S., and Farrand, SK. 1993. Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. Nature. 362 : 448–50.
- Podbielski, A and Kreikemeyer, B. 2004. Cell density - dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci. International Journal of Infectious Diseases. 8 : 81–95.
- Prakitchaiwattana, C., Det-udom, R. and Kuakpetoon, D. Development of analytical methods for food pathogen *Vibrio parahaemolyticus* by detecting quorum sensing, Acyl Homoserine Lactone (AHL) using colorimetry and HPLC methods. Chemical Abstracts (2009): Abstract No.1260–2P.
- Ravn, L., Christensen, A.B., Molin, S., Givskov, M., and Gram, L. 2001. Methods for detecting acylated homoserine lactones produced by gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics. Journal of Microbiological Methods. 44 : 239–251
- Rosemeyer, V., Michiels, J., Verreth, C., and Vanderleyden, J. 1998. *luxI*- and *luxR*-homologous genes of *Rhizobium etli* CNPAF512 contribute to synthesis of autoinducer molecules and nodulation of *Phaseolus vulgaris*. Journal of Bacteriology. 180 : 815–21.
- Rudner, D.Z., LeDeaux, J.R., Ireton, K. and Grossman, A.D. 1991. The *spo0K* locus of *Bacillus subtilis* is homologous to the oligopeptide permease locus and is required for sporulation and competence. Journal of Bacteriology. 173 : 1388–1398.
- Schauder, S., Shokat, K., Surette, M.G. and Bassler, B.L., 2001. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. Molecular Microbiology. 41 : 463–476.
- Schaefer, A.L. 1996. Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. Proceedings of the National Academy of Sciences. 93 : 9505–9509.

- Sewald, X., Saum, S.H., Palm, P., Pfeiffer, F., Oesterhelt, D., and Muller, V. 2007. Autoinducer-2-producing protein luxS, a novel salt- and chloride-induced protein in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus halophilus*. Applied and Environmental Microbiology. 73(2) : 371–379.
- Shaw, P.D., Ping, G., Daly, S.L., Cha, C., Cronan Jr., J.E., Rinehart, K.L. and Farrand, S.K. 1997. Detecting and characterizing N-acylhomoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. Proceedings of the National Academy of Sciences. 94 : 6036–6041.
- Shen, X., Cai, Y., Liu, C., Liu, W., Hui, Y. and Su, Y.C. 2009. Effect of temperature on uptake and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters (*Crassostrea plicatula*). International Journal of Food Microbiology. 136 : 129–132.
- Singh, M.P., and Greenstein, M. 2005. A simple, rapid, sensitive method detecting homoserine lactone (HSL)-related compounds in microbial extracts. Journal of Microbiological Methods.
- Su, Y.C. and Liu, C. 2007. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. Food Microbiology. 24 : 549–558.
- Swift, S, Karlyshev, AV, Fish, L., Durant, E.L., and Winson, MK. 1997. Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: identification of the LuxRI homologs AhyRI and AsaRI and their cognate N-acylhomoserine lactone signal molecules. Journal of Bacteriology. 179 : 5271–81.
- Swift, S, Lynch, MJ, Fish, L, Kirke, DF, and Tomas, JM. 1999. Quorum sensing dependent regulation and blockade of exoprotease production in *Aeromonas hydrophila*. Infection Immunology. 67 : 5192–99.
- Tada, J., Ohashi, T., Nishimura, N., Shirasaki, Y., Ozaki, H., Fukushima, S., Takano, J., Nishibuchi, M. and Takeda, Y. 1992. Detection of the thermostable direct hemolysin gene (*tdh*) and the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*) of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction. Molecular Cell Probes. 6 : 477–487.
- Takano, E., Chakraburty, R., Nihira, T., Yamada, Y. and Bibb, M.J. 2001. A complex role for the gamma-butyrolactone SCB1 in regulating antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Molecular Microbiology. 41 : 1015–1028.

- Throup, J. P., M. Camara, G. S. Briggs, M. K. Winson, S. R. Chhabra, B. W. Bycroft, P. Williams, and G. S. A. B. Stewart. 1995. Characterisation of the *yenI/R* locus from *Yersinia enterocolitica* mediating the synthesis of two *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules. Molecular Microbiology. 17 : 345–356.
- U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration, Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation Online. [online]. Available from : <http://www.fda.gov/CDER/guidance/4252fnl.htm>. [2009, June 8]
- US Food and Drug Administration (FDA). 2004. Bacteriological Analytical Manual Online. [online]. Available from : http://www.cfsan.fda.gov/_ebam/bam-toc.html. [2009, February 14].
- United States Department of Agriculture (USDA). 2008. Most Probable Number Procedure and Tables. [online]. Available from : http://www.cfsan.fda.gov/_ebam/bam-toc.html. [2009, February 14].
- Valenzuela, S., Banderas, A., Jerez, C.A. and Guiliani, N. 2007. Cell-cell communication in bacteria. Microbial Processing of Metal Sulfides. 253–264.
- Valiente, E., Bruhn, J.B., Nielsen, K.F., Larsen, J.L., Roig, F.J., Gram, L. and Amaro, C. 2009. *Vibrio vulnificus* produces *quorum sensing* signals of the AHL-class. FEMS Microbiology Ecology. 69 : 16–26.
- Walters, M. and Sperandio, V. 2006. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*. International Journal of Medical Microbiology. 296 : 125–131.
- Winson, M.K., Swift, S., Fish, L., Throup, J.P.J.P., Jørgensen, F., Chhabra, S.R., Bycroft, B.W., Williams, P. and Stewart, G.S.A.B. 1998. Construction of *luxCDABE*-based plasmid sensors for investigating *N*-acyl homoserine lactone mediates quorum sensing. FEMS Microbiological Letter. 163 : 185– 192.
- Wood, D.W., Gong, F., Daykin, M.M., Williams, P., and Pierson, L.S. 1997. *N*-Acyl-Homoserine lactone-mediated regulation of phenazine gene expression by *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. Journal of Bacteriology. 179 : 7663–7670.
- Yang, Y.H., Lee, T.H., Kim, J.H., Kim, E.J., Joo, H.S., Lee, C.S. and Kim, B.G. 2006. High-throughput detection method of quorum-sensing molecules by colorimetry and its applications. Analytical Biochemistry. 356 : 297–299.

- Yates, E.A., Philipop, B., Buckley, C., Atkinson, S., Chhabra, S.R., Sockett, R.E., Goldner, M., Dessaux, Y., Camara, M., Smith, H. and Williams, P. 2002. *N*-acyl homoserine lactones undergo lactonolysis in a pH, temperature and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Psuedomonas aeruginosa*. Infection and Immunity. 70 : 5653–5654.
- Zhu, J. and Mekalanos, J.J. 2003. Quorum sensing-dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae*. Developmental Cell. 5 : 647–656.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ทางเคมี

ก.1 AHL standard stock solution (0.005 M)

ละลาย N-(β -ketocaproyl)-L-homoserine lactone 0.0011 g (3-oxo-C6-HSL, Sigma-Aldrich, USA) ลงในน้ำกลั่น deionized 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่ -35°C จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์

ก.2 Reagent I และ Reagent II สำหรับการวิเคราะห์ AHL ด้วยวิธี colorimetry (Yang และคณะ, 2006)

ก.2.1 สารเคมี

- 1) 3.5 M sodium hydroxide
- 2) 2 M hydroxylamine hydrochloride
- 3) 10%(w/v) ferric chloride ใน 4 M hydrochloric acid
- 4) 95% ethanol
- 5) 50% methanol

ก.2.2 วิธีการเตรียมสารเคมี

- 1) 3.5 M sodium hydroxide: ละลาย sodium hydroxide 14 g ลงใน 50% methanol แล้วปรับปริมาตรด้วย 50% methanol ให้ได้ 100 ml
- 2) 2 M hydroxylamine hydrochloride : ละลาย hydroxylamine hydrochloride 7 g ลงใน 50% methanol แล้วปรับปริมาตรด้วย 50% methanol ให้ได้ 100 ml
- 3) 10% (w/v) ferric chloride ใน 4 M hydrochloric acid: เตรียม 4 M hydrochloric acid โดยเติม 36% HCl (11.64 M) 34 ml ลงใน 50% methanol 66 ml จากนั้นเตรียม 10% ferric chloride โดยเติม ferric chloride 10 g ลงใน 4 M hydrochloric acid 100 ml
- 4) 95% ethanol : เติมน้ำ deionized 4 ml ลงใน 99% ethanol 96 ml แล้วผสมให้เข้ากัน

5) 50% methanol : เติมน้ำ deionized 49 ml ลงใน 99% methanol 51 ml แล้วผสมให้เข้ากัน

ก.2.3 การเตรียม Reagent I และ Reagent II

- 1) Reagent I : ผสม 2 M hydroxylamine hydrochloride 50 ml กับ 3.5 M sodium hydroxide 50 ml
- 2) Reagent II : ผสม 10% (w/v) ferric chloride ใน 4 M hydrochloric acid 50 ml กับ 95% ethanol 50 ml

ก.3 การเตรียมสารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ AHL ด้วยวิธี colorimetry (Leitao และ Esteves da Silva, 2008)

ก.3.1 สารเคมี

- 1) 18.750% sodium hydroxide
- 2) 9.375% hydroxylamine hydrochloride
- 3) 2.000% ferric ammonium sulphate
- 4) 7% perchloric acid

ก.3.2 วิธีการเตรียมสารเคมี

- 1) 18.750% sodium hydroxide: ละลาย sodium hydroxide 18.750 g ลงในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 ml
- 2) 9.375% Hydroxylamine hydrochloride: ละลาย Hydroxylamine hydrochloride 9.375 g ลงในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 ml
- 3) ferric reagent : ละลาย ferric ammonium sulphate 2 g ใน 7% perchloric acid 10 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 ml
- 4) 7% perchloric acid : เจือจางสารละลาย 70% (w/w) perchloric acid 5 g ด้วยน้ำกลั่น 25 ml

ก.3.3 การเตรียม reagent

Hydroxylamine reagent: ผสม 9.375% Hydroxylamine hydrochloride กับ 18.750% sodium hydroxide ในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

ข.1 วิธีวิเคราะห์ค่า Most Probable Number (MPN) ของห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (USFDA-BAM, 2001)

1. การเตรียมสารละลายเจือจาง

ปิเปตตัวอย่าง 1 มล. เติมลงใน diluent ที่เหมาะสมปริมาตร 9 มล. (ความเข้มข้น 0.1) แล้วทำการเจือจางต่อให้ได้ความเข้มข้น 0.01 และ 0.001 จากนั้นปิเปต สารละลาย ตัวอย่างทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น อย่างละ 1 มล. ลงในหลอด Alkaline peptone water 9 มิลลิลิตร จำนวนความเข้มข้นละ 3 หลอด (รวมทั้งหมดจะได้ 9 หลอด) บ่มที่ 35 ± 2 องศา 24 ชั่วโมง

2. การตรวจสอบการเจริญของเชื้อ

Streak เชื้อจากส่วนบนห่างจากผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 เซนติเมตร ของ หลอดที่มีการเจริญลงบนจานเพาะเชื้อ TCBS บ่มที่ 35 ± 2 องศา 24 ชั่วโมง

3. การอ่านผล

นับจำนวนหลอดของแต่ละความเข้มข้นที่พบการเจริญของเชื้อ แล้วแปรผลโดย อ่านจากตาราง MPN 3

ตาราง ๑.1 MPN Index and 95% Confidence Limits for Various Combinations of Positive Tubes Dilution Series Using Inoculum Quantities of 0.1, 0.01 and 0.001 g (ml)

Combination of Positives	MPN Index per g (ml)	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
0-0-0	<3.0	---	9.5
0-0-1	3.0	0.15	9.6
0-1-0	3.0	0.15	11.
0-1-1	6.1	1.2	18.
0-2-0	6.2	1.2	18.
0-3-0	9.4	3.6	38.
1-0-0	3.6	0.17	18.
1-0-1	7.2	1.3	18.
1-0-2	11.	3.6	38.
1-1-0	7.4	1.3	20.
1-1-1	11.	3.6	38.
1-2-0	11.	3.6	42.
1-2-1	15.	4.5	42.
1-3-0	16.	4.5	42.
2-0-0	9.2	1.4	38.
2-0-1	14.	3.6	42.
2-0-2	20.	4.5	42.
2-1-0	15.	3.7	42.
2-1-1	20.	4.5	42.
2-1-2	27.	8.7	94.
2-2-0	21.	4.5	42.
2-2-1	28.	8.7	94.
2-2-2	35.	8.7	94.
2-3-0	29.	8.7	94.
2-3-1	36.	8.7	94.
3-0-0	23.	4.6	94.
3-0-1	38.	8.7	110.
3-0-2	64.	17.	180.
3-1-0	43.	9.0	180.
3-1-1	75.	17.	200.
3-1-2	120.	37.	420.
3-1-3	160.	40.	420.
3-2-0	93.	18.	420.
3-2-1	150.	37.	420.
3-2-2	210.	40.	430.
3-2-3	290.	90.	1000.
3-3-0	240.	42.	1000.
3-3-1	460.	90.	2000.
3-3-2	1100.	180.	4100.
3-3-3	>1100.	420.	-

ที่มา United States Department of Agriculture; USDA (2008)

ภาคผนวก ค

ข้อมูลผลการทดลองเพิ่มเติม

ตารางที่ ค.1 % measured absorbance (ปริมาณ AHL ที่เชื้อสร้างขึ้นต่อหน่วยเซลล์ของ *V. parahaemolyticus*) ที่คำนวณได้ที่เวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง (รัชิตา เดชอุดม, 2550)

<i>V.parahaemolyticus</i> strains	% measured absorbance*		
	12 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
non-pathogenic			
DMST 22092	0.7502 ^a ± 0.0347	0.8739 ^a ± 0.0118	3.0283 ^a ± 0.1628
DMST 22093	0.6812 ^b ± 0.0182	0.8640 ^a ± 0.0121	1.9445 ^b ± 0.0617
ATCC 17802	0.7112 ^b ± 0.0231	0.8599 ^a ± 0.0104	2.6879 ^c ± 0.0333
pathogenic			
DMST 23797	0.6951 ^b ± 0.0760	0.8667 ^a ± 0.0108	4.1989 ^d ± 0.2124
DMST 23798	0.6902 ^b ± 0.0137	0.8561 ^a ± 0.0089	2.0472 ^b ± 0.0539
DMST 23799	0.7149 ^b ± 0.0197	0.8553 ^a ± 0.0172	2.4647 ^e ± 0.0865

^{a,b,c,...} ค่าที่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

* ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ ค.2 จำนวนเซลล์และปริมาณ AHL บ่งชี้ด้วยค่า OD₅₂₀ เมื่อเพาะเลี้ยง *V. parahaemolyticus* ในสภาวะที่ไม่ให้อากาศ ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น 6logCFU/ml

เซลล์เริ่มต้น (logCFU/ml)	Detection time เดิม (14 ชั่วโมง)		ชั่วโมงที่ 30	
	จำนวนเซลล์ (logCFU/ml)	ปริมาณ AHL (OD ₅₂₀)	จำนวนเซลล์ (logCFU/ml)	ปริมาณ AHL (OD ₅₂₀)
6.18±0.05	7.05±0.08	0.004±0.002	8.16±0.01	0.033±0.001

ภาคผนวก ง

ผลการประมาณจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ด้วยวิธีมาตรฐาน MPN

ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พญาไท กรุงเทพฯ 10330

หน้าที่ 1 ของจำนวน 1 หน้า

วันที่รายงานผล 4 มกราคม 2553

----- เริ่ม รายงาน -----

รายงานการทดสอบ

หมายเลขรายงานที่ M 0319/09

ชื่อและที่อยู่ผู้ส่งตัวอย่างทดสอบ

ผศ.ดร. ชื่นจิต ประภิตชัยวัฒนา MRG-WI 515S066 ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ส่งตัวอย่าง: ผู้ส่งตัวอย่างเป็นผู้ส่งตัวอย่าง

รายละเอียดตัวอย่างทดสอบ

ชื่อตัวอย่าง: V93.1 suspension

รหัส/รุ่น(สินค้า): -

รหัสตัวอย่างที่: -

บรรจุภัณฑ์: หลอดทดลองแก้ว มีฝาพลาสติกปิดปากหลอด

ลักษณะตัวอย่าง: ของเหลวสีเหลืองอ่อน ขุ่น

วันที่รับตัวอย่าง: 30/12/52

วันที่ทดสอบแล้วเสร็จ: 04/01/53

ผลการทดสอบ

รายการที่ทดสอบ	ผล	วิธีทดสอบ
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , TPC	6.00×10^6 CFU/ml.	FDA-BAM
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , MPN	> 1100/ml.	FDA-BAM

หมายเหตุ :

----- สิ้นสุด รายงาน -----

ลงชื่อ.....

(นางสาวรัชชิตา เลขอุดม)

ผู้จัดการวิชาการจุลชีววิทยา

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเชิธร)

รองผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ ก๊กผล)

ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ผลการทดสอบนี้รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทดสอบเท่านั้น

ห้ามนำรายงานการทดสอบนี้ไปประกาศ

ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พญาไท กรุงเทพฯ 10330

หน้าที่ 1 ของจำนวน 1 หน้า

วันที่รายงานผล 4 มกราคม 2553

----- เริ่ม รายงาน -----

รายงานการทดสอบ

หมายเลขรายงานที่ M 0320/09

ชื่อและที่อยู่ผู้ส่งตัวอย่างทดสอบ

ผศ.ดร. ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา MRG-WI 515S066 ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ส่งตัวอย่าง: ผู้ส่งตัวอย่างเป็นผู้ส่งตัวอย่าง

รายละเอียดตัวอย่างทดสอบ

ชื่อตัวอย่าง: V93.2 suspension

รหัส/รุ่น(สินค้า): -

รหัสตัวอย่างที่: -

บรรจุภัณฑ์: หลอดทดลองแก้ว มีฝาพลาสติกปิดปากหลอด

ลักษณะตัวอย่าง: ของเหลวสีเหลืองอ่อน ขุ่น

วันที่รับตัวอย่าง: 30/12/52

วันที่ทดสอบแล้วเสร็จ: 04/01/53

ผลการทดสอบ

รายการที่ทดสอบ	ผล	วิธีทดสอบ
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , TPC	8.13×10^5 CFU/ml.	FDA-BAM
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , MPN	> 1100/ml.	FDA-BAM

หมายเหตุ :

----- สิ้นสุด รายงาน -----

ลงชื่อ.....

(นางสาวรัชชิตา เดชอุดม)

ผู้จัดการวิชาการจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเชียร)

รองผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ กักผล)

ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ผลการทดสอบนี้รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทดสอบเท่านั้น

ห้ามนำรายงานการทดสอบนี้ไปประกาศ

ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พญาไท กรุงเทพฯ 10330

หน้าที่ 1 ของจำนวน 1 หน้า
วันที่รายงานผล 4 มกราคม 2553

----- เริ่ม รายงาน -----

รายงานการทดสอบ

หมายเลขรายงานที่ M 0321/09

ชื่อและที่อยู่ผู้ส่งตัวอย่างทดสอบ

ผศ.ดร. ชื่นจิต ประภคชัชวัฒนา MRG-WI 515S066 ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ส่งตัวอย่าง: ผู้ส่งตัวอย่างเป็นผู้ส่งตัวอย่าง

รายละเอียดตัวอย่างทดสอบ

ชื่อตัวอย่าง: V93.3 suspension

รหัส/รุ่น(สินค้า): -

รหัสตัวอย่างที่: -

บรรจุภัณฑ์: หลอดทดลองแก้ว มีฝาพลาสติกปิดปากหลอด

ลักษณะตัวอย่าง: ของเหลวสีเหลืองอ่อน ขุ่น

วันที่รับตัวอย่าง: 30/12/52

วันที่ทดสอบแล้วเสร็จ: 04/01/53

ผลการทดสอบ

รายการที่ทดสอบ	ผล	วิธีทดสอบ
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , TPC	6.57×10^4 CFU/ml.	FDA-BAM
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , MPN	> 1100/ml.	FDA-BAM

หมายเหตุ :

----- สิ้นสุด รายงาน -----

ลงชื่อ.....

(นางสาวรัชชิตา เดชอุดม)

ผู้จัดการวิชาการจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเชียร)

รองผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ กักผล)

ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ผลการทดสอบนี้รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทดสอบเท่านั้น

ห้ามนำรายงานการทดสอบนี้ไปประกาศ

ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พญาไท กรุงเทพฯ 10330

หน้าที่ 1 ของจำนวน 1 หน้า
วันที่รายงานผล 4 มกราคม 2553

----- เริ่ม รายงาน -----

รายงานการทดสอบ

หมายเลขรายงานที่ M 0322/09

ชื่อและที่อยู่ผู้ส่งตัวอย่างทดสอบ

ผศ.ดร. ชื่นจิต ประภคชัชวาลนา MRG-WI 515S066 ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ส่งตัวอย่าง: ผู้ส่งตัวอย่างเป็นผู้ส่งตัวอย่าง

รายละเอียดตัวอย่างทดสอบ

ชื่อตัวอย่าง: V93.4 suspension

รหัส/รุ่น(สินค้า): -

รหัสตัวอย่างที่: -

บรรจุภัณฑ์: หลอดทดลองแก้ว มีฝาพลาสติกปิดปากหลอด

ลักษณะตัวอย่าง: ของเหลวสีเหลืองอ่อน ขุ่น

วันที่รับตัวอย่าง: 30/12/52

วันที่ทดสอบแล้วเสร็จ: 04/01/53

ผลการทดสอบ

รายการที่ทดสอบ	ผล	วิธีทดสอบ
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , TPC	7.63×10^3 CFU/ml.	FDA-BAM
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , MPN	> 1100/ml.	FDA-BAM

หมายเหตุ :

----- สิ้นสุด รายงาน -----

ลงชื่อ.....

(นางสาวรัชชิตา เลขอุดม)

ผู้จัดการวิชาการจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศุเมธ ตันตระเชิษร)

รองผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ ก๊กผล)

ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ผลการทดสอบนี้รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทดสอบเท่านั้น
ห้ามนำรายงานการทดสอบนี้ไปประกาศ

ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พญาไท กรุงเทพฯ 10330

หน้าที่ 1 ของจำนวน 1 หน้า
วันที่รายงานผล 4 มกราคม 2553

----- เริ่ม รายงาน -----

รายงานการทดสอบ

หมายเลขรายงานที่ M 0323/09

ชื่อและที่อยู่ผู้ส่งตัวอย่างทดสอบ

ผศ.ดร. ชื่นจิต ประภคชัชวัฒนา MRG-WI 515S066 ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ส่งตัวอย่าง: ผู้ส่งตัวอย่างเป็นผู้ส่งตัวอย่าง

รายละเอียดตัวอย่างทดสอบ

ชื่อตัวอย่าง: V93.5 suspension

รหัส/รุ่น(สินค้า): -

รหัสตัวอย่างที่: -

บรรจุภัณฑ์: หลอดทดลองแก้ว มีฝาพลาสติกปิดปากหลอด

ลักษณะตัวอย่าง: ของเหลวสีเหลืองอ่อน ขุ่น

วันที่รับตัวอย่าง: 30/12/52

วันที่ทดสอบแล้วเสร็จ: 04/01/53

ผลการทดสอบ

รายการที่ทดสอบ	ผล	วิธีทดสอบ
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , TPC	7.73×10^2 CFU/ml.	FDA-BAM
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , MPN	> 1100/ml.	FDA-BAM

หมายเหตุ :

----- สิ้นสุด รายงาน -----

ลงชื่อ.....

(นางสาวรัชชิตา เดชอุดม)

ผู้จัดการวิชาการจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเชียร)

รองผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ กักผล)

ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ผลการทดสอบนี้รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทดสอบเท่านั้น

ห้ามนำรายงานการทดสอบนี้ไปประกาศ

ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พญาไท กรุงเทพฯ 10330

หน้าที่ 1 ของจำนวน 1 หน้า

วันที่รายงานผล 4 มกราคม 2553

----- เริ่ม รายงาน -----

รายงานการทดสอบ

หมายเลขรายงานที่ M 0324/09

ชื่อและที่อยู่ผู้ส่งตัวอย่างทดสอบ

ผศ.ดร. ชื่นจิต ประภคชัชวัฒนา MRG-WI 515S066 ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ส่งตัวอย่าง: ผู้ส่งตัวอย่างเป็นผู้ส่งตัวอย่าง

รายละเอียดตัวอย่างทดสอบ

ชื่อตัวอย่าง: V93.6 suspension

รหัส/รุ่น(สินค้า): -

รหัสตัวอย่างที่: -

บรรจุภัณฑ์: หลอดทดลองแก้ว มีฝาพลาสติกปิดปากหลอด

ลักษณะตัวอย่าง: ของเหลวสีเหลืองอ่อน ขุ่น

วันที่รับตัวอย่าง: 30/12/52

วันที่ทดสอบแล้วเสร็จ: 04/01/53

ผลการทดสอบ

รายการที่ทดสอบ	ผล	วิธีทดสอบ
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , TPC	7.60×10^1 CFU/ml.	FDA-BAM
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , MPN	> 1100/ml.	FDA-BAM

หมายเหตุ :

----- สิ้นสุด รายงาน -----

ลงชื่อ.....

(นางสาวรัชชิตา เดชอุดม)

ผู้จัดการวิชาการจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเชียร)

รองผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ กักผล)

ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ผลการทดสอบนี้รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทดสอบเท่านั้น

ห้ามนำรายงานการทดสอบนี้ไปประกาศ

ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พญาไท กรุงเทพฯ 10330

หน้าที่ 1 ของจำนวน 1 หน้า

วันที่รายงานผล 23 กุมภาพันธ์ 2553

----- เริ่ม รายงาน -----

รายงานการทดสอบ

หมายเลขรายงานที่ TM0041/10

ชื่อและที่อยู่ผู้ส่งตัวอย่างทดสอบ

ผศ.ดร. ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา MRG-WI 515S066 ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ส่งตัวอย่าง: ผู้ส่งตัวอย่างเป็นผู้ส่งตัวอย่าง

รายละเอียดตัวอย่างทดสอบ

ชื่อตัวอย่าง: กุ้งสดทั้งตัว

รหัส/รุ่น(สินค้า): -

รหัสตัวอย่างที่: M0036/10

บรรจุภัณฑ์: ถุงพลาสติกขุ่น ปิดปากถุงด้วยแถบกาวพลาสติก

ลักษณะตัวอย่าง: กุ้งสดไม่แกะเปลือก

วันที่รับตัวอย่าง: 21 มกราคม 2553

วันที่ทดสอบแล้วเสร็จ: 26 มกราคม 2553

ผลการทดสอบ

รายการที่ทดสอบ	ผล	วิธีทดสอบ
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	< 3 MPN/g.	FDA-BAM

หมายเหตุ : อ้างอิง Food and Drug Administration, 2001.

----- สิ้นสุด รายงาน -----

ลงชื่อ.....

(นางสาวรัชชิตา เดชอุดม)

ผู้จัดการวิชาการจุลชีววิทยา

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเชียร)

รองผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ กักผล)

ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ผลการทดสอบนี้รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทดสอบเท่านั้น

ห้ามนำรายงานการทดสอบนี้ไปประกาศ

ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พญาไท กรุงเทพฯ 10330

หน้าที่ 1 ของจำนวน 1 หน้า

วันที่รายงานผล 23 กุมภาพันธ์ 2553

----- เริ่ม รายงาน -----

รายงานการทดสอบ

หมายเลขรายงานที่ TM0042/10

ชื่อและที่อยู่ผู้ส่งตัวอย่างทดสอบ

ผศ.ดร. ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา MRG-WI 515S066 ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ส่งตัวอย่าง: ผู้ส่งตัวอย่างเป็นผู้ส่งตัวอย่าง

รายละเอียดตัวอย่างทดสอบ

ชื่อตัวอย่าง: ปลาหมึกสดทั้งตัว

รหัส/รุ่น(สินค้า): -

รหัสตัวอย่างที่: M0037/10

บรรจุภัณฑ์: ถุงพลาสติกขุ่น ปิดปากถุงด้วยแถบกาวยพลาสติก

ลักษณะตัวอย่าง: ปลาหมึกสดทั้งตัวพร้อมหัว

วันที่รับตัวอย่าง: 21 มกราคม 2553

วันที่ทดสอบแล้วเสร็จ: 26 มกราคม 2553

ผลการทดสอบ

รายการที่ทดสอบ	ผล	วิธีทดสอบ
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	< 3 MPN/g.	FDA-BAM

หมายเหตุ : อ้างอิง Food and Drug Administration, 2001.

----- สิ้นสุด รายงาน -----

ลงชื่อ.....

(นางสาวรัชชิตา เดชอุดม)

ผู้จัดการวิชาการจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเชียร)

รองผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ กักผล)

ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ผลการทดสอบนี้รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทดสอบเท่านั้น

ห้ามนำรายงานการทดสอบนี้ไปประกาศ

ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พญาไท กรุงเทพฯ 10330

หน้าที่ 1 ของจำนวน 1 หน้า

วันที่รายงานผล 23 กุมภาพันธ์ 2553

----- เริ่ม รายงาน -----

รายงานการทดสอบ

หมายเลขรายงานที่ TM0043/10

ชื่อและที่อยู่ผู้ส่งตัวอย่างทดสอบ

ผศ.ดร. ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา MRG-WI 515S066 ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ส่งตัวอย่าง: ผู้ส่งตัวอย่างเป็นผู้ส่งตัวอย่าง

รายละเอียดตัวอย่างทดสอบ

ชื่อตัวอย่าง: หอยนางรมสดแกะเปลือก

รหัส/รุ่น(สินค้า): -

รหัสตัวอย่างที่: M0038/10

บรรจุภัณฑ์: ถุงพลาสติกขุน ปิดปากถุงด้วยแถบกาพลาสติก

ลักษณะตัวอย่าง: เนื้อหอยนางรมสดทั้งตัว

วันที่รับตัวอย่าง: 21 มกราคม 2553

วันที่ทดสอบแล้วเสร็จ: 26 มกราคม 2553

ผลการทดสอบ

รายการที่ทดสอบ	ผล	วิธีทดสอบ
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	< 3 MPN/g.	FDA-BAM

หมายเหตุ : อ้างอิง Food and Drug Administration, 2001.

----- สิ้นสุด รายงาน -----

ลงชื่อ.....

(นางสาวรัชชิตา เดชอุดม)

ผู้จัดการวิชาการจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเชียร)

รองผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ กักผล)

ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ผลการทดสอบนี้รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทดสอบเท่านั้น

ห้ามนำรายงานการทดสอบนี้ไปประกาศ

ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พญาไท กรุงเทพฯ 10330

หน้าที่ 1 ของจำนวน 1 หน้า

วันที่รายงานผล 23 กุมภาพันธ์ 2553

----- เริ่ม รายงาน -----

รายงานการทดสอบ

หมายเลขรายงานที่ TM0044/10

ชื่อและที่อยู่ผู้ส่งตัวอย่างทดสอบ

ผศ.ดร. ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา MRG-WI 515S066 ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ส่งตัวอย่าง: ผู้ส่งตัวอย่างเป็นผู้ส่งตัวอย่าง

รายละเอียดตัวอย่างทดสอบ

ชื่อตัวอย่าง: กุ้งสดปอกเปลือกทั้งหาง

รหัส/รุ่น(สินค้า): -

รหัสตัวอย่างที่: M0042/10

บรรจุภัณฑ์: ถุงพลาสติกทึบแสง

ลักษณะตัวอย่าง: เนื้อกุ้งสดทั้งตัว ไม่มีเปลือกและหัว

วันที่รับตัวอย่าง: 29 มกราคม 2553

วันที่ทดสอบแล้วเสร็จ: 12 กุมภาพันธ์ 2553

ผลการทดสอบ

รายการที่ทดสอบ	ผล	วิธีทดสอบ
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	< 3 MPN/g.	FDA-BAM

หมายเหตุ : อ้างอิง Food and Drug Administration, 2001.

----- สิ้นสุด รายงาน -----

ลงชื่อ.....

(นางสาวรัชชิตา เดชอุดม)

ผู้จัดการวิชาการจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเชียร)

รองผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ กักผล)

ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ผลการทดสอบนี้รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทดสอบเท่านั้น

ห้ามนำรายงานการทดสอบนี้ไปประกาศ

ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พญาไท กรุงเทพฯ 10330

หน้าที่ 1 ของจำนวน 1 หน้า

วันที่รายงานผล 23 กุมภาพันธ์ 2553

----- เริ่ม รายงาน -----

รายงานการทดสอบ

หมายเลขรายงานที่ TM0045/10

ชื่อและที่อยู่ผู้ส่งตัวอย่างทดสอบ

ผศ.ดร. ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา MRG-WI 515S066 ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ส่งตัวอย่าง: ผู้ส่งตัวอย่างเป็นผู้ส่งตัวอย่าง

รายละเอียดตัวอย่างทดสอบ

ชื่อตัวอย่าง: เนื้อกุ้งสดบดละเอียด

รหัส/รุ่น(สินค้า): -

รหัสตัวอย่างที่: M0043/10

บรรจุภัณฑ์: ถุงพลาสติกทึบแสง

ลักษณะตัวอย่าง: เนื้อกุ้งสดบดละเอียด สีขาวปนชมพูอ่อน

วันที่รับตัวอย่าง: 29 มกราคม 2553

วันที่ทดสอบแล้วเสร็จ: 12 กุมภาพันธ์ 2553

ผลการทดสอบ

รายการที่ทดสอบ	ผล	วิธีทดสอบ
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	< 3 MPN/g.	FDA-BAM

หมายเหตุ : อ้างอิง Food and Drug Administration, 2001.

----- สิ้นสุด รายงาน -----

ลงชื่อ.....

(นางสาวรัชชิตา เดชอุดม)

ผู้จัดการวิชาการจุลชีววิทยา

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเชียร)

รองผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ กักผล)

ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ผลการทดสอบนี้รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทดสอบเท่านั้น

ห้ามนำรายงานการทดสอบนี้ไปประกาศ

ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พญาไท กรุงเทพฯ 10330

หน้าที่ 1 ของจำนวน 1 หน้า

วันที่รายงานผล 23 กุมภาพันธ์ 2553

----- เริ่ม รายงาน -----

รายงานการทดสอบ

หมายเลขรายงานที่ TM0046/10

ชื่อและที่อยู่ผู้ส่งตัวอย่างทดสอบ

ผศ.ดร. ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา MRG-WI 515S066 ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ส่งตัวอย่าง: ผู้ส่งตัวอย่างเป็นผู้ส่งตัวอย่าง

รายละเอียดตัวอย่างทดสอบ

ชื่อตัวอย่าง: กุ้งสดทั้งตัว

รหัส/รุ่น(สินค้า): -

รหัสตัวอย่างที่: M0044/10

บรรจุภัณฑ์: ถุงพลาสติกทึบแสง

ลักษณะตัวอย่าง: กุ้งสดทั้งตัวพร้อมเปลือก มีกลิ่นคาวแรง

วันที่รับตัวอย่าง: 29 มกราคม 2553

วันที่ทดสอบแล้วเสร็จ: 12 กุมภาพันธ์ 2553

ผลการทดสอบ

รายการที่ทดสอบ	ผล	วิธีทดสอบ
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	< 3 MPN/g.	FDA-BAM

หมายเหตุ : อ้างอิง Food and Drug Administration, 2001.

----- สิ้นสุด รายงาน -----

ลงชื่อ.....

(นางสาวรัชชิตา เดชอุดม)

ผู้จัดการวิชาการจุลชีววิทยา

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเชียร)

รองผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ กักผล)

ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ผลการทดสอบนี้รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทดสอบเท่านั้น

ห้ามนำรายงานการทดสอบนี้ไปประกาศ

ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พญาไท กรุงเทพฯ 10330

หน้าที่ 1 ของจำนวน 1 หน้า

วันที่รายงานผล 23 กุมภาพันธ์ 2553

----- เริ่ม รายงาน -----

รายงานการทดสอบ

หมายเลขรายงานที่ TM0047/10

ชื่อและที่อยู่ผู้ส่งตัวอย่างทดสอบ

ผศ.ดร. ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา MRG-WI 515S066 ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ส่งตัวอย่าง: ผู้ส่งตัวอย่างเป็นผู้ส่งตัวอย่าง

รายละเอียดตัวอย่างทดสอบ

ชื่อตัวอย่าง: กุ้งสด 735

รหัส/รุ่น(สินค้า): -

รหัสตัวอย่างที่: M0062/10

บรรจุภัณฑ์: ถุงพลาสติกทึบแสง

ลักษณะตัวอย่าง: เนื้อกุ้งสด

วันที่รับตัวอย่าง: 11 กุมภาพันธ์ 2553

วันที่ทดสอบแล้วเสร็จ: 17 กุมภาพันธ์ 2553

ผลการทดสอบ

รายการที่ทดสอบ	ผล	วิธีทดสอบ
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	< 3 MPN/g.	FDA-BAM

หมายเหตุ : อ้างอิง Food and Drug Administration, 2001.

----- สิ้นสุด รายงาน -----

ลงชื่อ.....

(นางสาวรัชชิตา เดชอุดม)

ผู้จัดการวิชาการจุลชีววิทยา

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเชียร)

รองผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ กักผล)

ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ผลการทดสอบนี้รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทดสอบเท่านั้น

ห้ามนำรายงานการทดสอบนี้ไปประกาศ

ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พญาไท กรุงเทพฯ 10330

หน้าที่ 1 ของจำนวน 1 หน้า

วันที่รายงานผล 23 กุมภาพันธ์ 2553

----- เริ่ม รายงาน -----

รายงานการทดสอบ

หมายเลขรายงานที่ TM0048/10

ชื่อและที่อยู่ผู้ส่งตัวอย่างทดสอบ

ผศ.ดร. ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา MRG-WI 515S066 ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ส่งตัวอย่าง: ผู้ส่งตัวอย่างเป็นผู้ส่งตัวอย่าง

รายละเอียดตัวอย่างทดสอบ

ชื่อตัวอย่าง: กุ้งสด 751

รหัส/รุ่น(สินค้า): -

รหัสตัวอย่างที่: M0063/10

บรรจุภัณฑ์: ถุงพลาสติกทึบแสง

ลักษณะตัวอย่าง: เนื้อกุ้งสด

วันที่รับตัวอย่าง: 11 กุมภาพันธ์ 2553

วันที่ทดสอบแล้วเสร็จ: 17 กุมภาพันธ์ 2553

ผลการทดสอบ

รายการที่ทดสอบ	ผล	วิธีทดสอบ
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	< 3 MPN/g.	FDA-BAM

หมายเหตุ : อ้างอิง Food and Drug Administration, 2001.

----- สิ้นสุด รายงาน -----

ลงชื่อ.....

(นางสาวรัชชิตา เดชอุดม)

ผู้จัดการวิชาการจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเชียร)

รองผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ กักผล)

ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ผลการทดสอบนี้รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทดสอบเท่านั้น

ห้ามนำรายงานการทดสอบนี้ไปประกาศ

ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พญาไท กรุงเทพฯ 10330

หน้าที่ 1 ของจำนวน 1 หน้า

วันที่รายงานผล 23 กุมภาพันธ์ 2553

----- เริ่ม รายงาน -----

รายงานการทดสอบ

หมายเลขรายงานที่ TM0049/10

ชื่อและที่อยู่ผู้ส่งตัวอย่างทดสอบ

ผศ.ดร. ชื่นจิต ประภคชัชวีพัฒนา MRG-WI 515S066 ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ส่งตัวอย่าง: ผู้ส่งตัวอย่างเป็นผู้ส่งตัวอย่าง

รายละเอียดตัวอย่างทดสอบ

ชื่อตัวอย่าง: กุ้งสด 753

รหัส/รุ่น(สินค้า): -

รหัสตัวอย่างที่: M0064/10

บรรจุภัณฑ์: ถุงพลาสติกทึบแสง

ลักษณะตัวอย่าง: เนื้อกุ้งสด

วันที่รับตัวอย่าง: 11 กุมภาพันธ์ 2553

วันที่ทดสอบแล้วเสร็จ: 17 กุมภาพันธ์ 2553

ผลการทดสอบ

รายการที่ทดสอบ	ผล	วิธีทดสอบ
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	< 3 MPN/g.	FDA-BAM

หมายเหตุ : อ้างอิง Food and Drug Administration, 2001.

----- สิ้นสุด รายงาน -----

ลงชื่อ.....

(นางสาวรัชชิตา เดชอุดม)

ผู้จัดการวิชาการจุลชีววิทยา

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเชียร)

รองผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ กักผล)

ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ผลการทดสอบนี้รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทดสอบเท่านั้น

ห้ามนำรายงานการทดสอบนี้ไปประกาศ

ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พญาไท กรุงเทพฯ 10330

หน้าที่ 1 ของจำนวน 1 หน้า

วันที่รายงานผล 23 กุมภาพันธ์ 2553

----- เริ่ม รายงาน -----

รายงานการทดสอบ

หมายเลขรายงานที่ TM0050/10

ชื่อและที่อยู่ผู้ส่งตัวอย่างทดสอบ

ผศ.ดร. ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา MRG-WI 515S066 ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ส่งตัวอย่าง: ผู้ส่งตัวอย่างเป็นผู้ส่งตัวอย่าง

รายละเอียดตัวอย่างทดสอบ

ชื่อตัวอย่าง: กุ้งสดทั้งตัว

รหัส/รุ่น(สินค้า): -

รหัสตัวอย่างที่: M0066/10

บรรจุภัณฑ์: ถุงพลาสติกทึบแสง

ลักษณะตัวอย่าง: กุ้งสดทั้งตัวพร้อมเปลือก

วันที่รับตัวอย่าง: 16 กุมภาพันธ์ 2553

วันที่ทดสอบแล้วเสร็จ: 22 กุมภาพันธ์ 2553

ผลการทดสอบ

รายการที่ทดสอบ	ผล	วิธีทดสอบ
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	> 1100 MPN/g.	FDA-BAM

หมายเหตุ : อ้างอิง Food and Drug Administration, 2001.

----- สิ้นสุด รายงาน -----

ลงชื่อ.....

(นางสาวรัชชิตา เดชอุดม)

ผู้จัดการวิชาการจุลชีววิทยา

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเชียร)

รองผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ กักผล)

ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ผลการทดสอบนี้รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทดสอบเท่านั้น

ห้ามนำรายงานการทดสอบนี้ไปประกาศ

ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พญาไท กรุงเทพฯ 10330

หน้าที่ 1 ของจำนวน 1 หน้า

วันที่รายงานผล 23 กุมภาพันธ์ 2553

----- เริ่ม รายงาน -----

รายงานการทดสอบ

หมายเลขรายงานที่ TM0052/10

ชื่อและที่อยู่ผู้ส่งตัวอย่างทดสอบ

ผศ.ดร. ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา MRG-WI 515S066 ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ส่งตัวอย่าง: ผู้ส่งตัวอย่างเป็นผู้ส่งตัวอย่าง

รายละเอียดตัวอย่างทดสอบ

ชื่อตัวอย่าง: ปลาหมึกสด

รหัส/รุ่น(สินค้า): -

รหัสตัวอย่างที่: M0068/10

บรรจุภัณฑ์: ถุงพลาสติกทึบแสง

ลักษณะตัวอย่าง: ปลาหมึกสดทั้งตัวพร้อมหัว

วันที่รับตัวอย่าง: 16 กุมภาพันธ์ 2553

วันที่ทดสอบแล้วเสร็จ: 22 กุมภาพันธ์ 2553

ผลการทดสอบ

รายการที่ทดสอบ	ผล	วิธีทดสอบ
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	< 3 MPN/g.	FDA-BAM

หมายเหตุ : อ้างอิง Food and Drug Administration, 2001.

----- สิ้นสุด รายงาน -----

ลงชื่อ.....

(นางสาวรัชชิตา เดชอุดม)

ผู้จัดการวิชาการจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเชียร)

รองผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ กักผล)

ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ผลการทดสอบนี้รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทดสอบเท่านั้น

ห้ามนำรายงานการทดสอบนี้ไปประกาศ

ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พญาไท กรุงเทพฯ 10330

หน้าที่ 1 ของจำนวน 1 หน้า

วันที่รายงานผล 26 กุมภาพันธ์ 2553

----- เริ่ม รายงาน -----

รายงานการทดสอบ

หมายเลขรายงานที่ TM0053/10

ชื่อและที่อยู่ผู้ส่งตัวอย่างทดสอบ

ผศ.ดร. ชื่นจิต ประภคชัชวพัฒนา MRG-WI 515S066 ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ส่งตัวอย่าง: ผู้ส่งตัวอย่างเป็นผู้ส่งตัวอย่าง

รายละเอียดตัวอย่างทดสอบ

ชื่อตัวอย่าง: กุ้งสด 648

รหัส/รุ่น(สินค้า): -

รหัสตัวอย่างที่: M0069/10

บรรจุภัณฑ์: ถุงพลาสติกทึบแสง

ลักษณะตัวอย่าง: กุ้งสด

วันที่รับตัวอย่าง: 24 กุมภาพันธ์ 2553

วันที่ทดสอบแล้วเสร็จ: 26 กุมภาพันธ์ 2553

ผลการทดสอบ

รายการที่ทดสอบ	ผล	วิธีทดสอบ
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	< 3 MPN/g.	FDA-BAM

หมายเหตุ : อ้างอิง Food and Drug Administration, 2001.

----- สิ้นสุด รายงาน -----

ลงชื่อ.....

(นางสาวรัชชิตา เดชอุดม)

ผู้จัดการวิชาการจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเชียร)

รองผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ กักผล)

ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ผลการทดสอบนี้รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทดสอบเท่านั้น

ห้ามนำรายงานการทดสอบนี้ไปประกาศ

ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พญาไท กรุงเทพฯ 10330

หน้าที่ 1 ของจำนวน 1 หน้า

วันที่รายงานผล 26 กุมภาพันธ์ 2553

----- เริ่ม รายงาน -----

รายงานการทดสอบ

หมายเลขรายงานที่ TM0054/10

ชื่อและที่อยู่ผู้ส่งตัวอย่างทดสอบ

ผศ.ดร. ชื่นจิต ประภคชัชวีณา MRG-WI 515S066 ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ส่งตัวอย่าง: ผู้ส่งตัวอย่างเป็นผู้ส่งตัวอย่าง

รายละเอียดตัวอย่างทดสอบ

ชื่อตัวอย่าง: กุ้งสด 748

รหัส/รุ่น(สินค้า): -

รหัสตัวอย่างที่: M0070/10

บรรจุภัณฑ์: ถุงพลาสติกทึบแสง

ลักษณะตัวอย่าง: กุ้งสด

วันที่รับตัวอย่าง: 24 กุมภาพันธ์ 2553

วันที่ทดสอบแล้วเสร็จ: 26 กุมภาพันธ์ 2553

ผลการทดสอบ

รายการที่ทดสอบ	ผล	วิธีทดสอบ
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	< 3 MPN/g.	FDA-BAM

หมายเหตุ : อ้างอิง Food and Drug Administration, 2001.

----- สิ้นสุด รายงาน -----

ลงชื่อ.....

(นางสาวรัชชิตา เดชอุดม)

ผู้จัดการวิชาการจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเชียร)

รองผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ กักผล)

ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ผลการทดสอบนี้รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทดสอบเท่านั้น

ห้ามนำรายงานการทดสอบนี้ไปประกาศ

ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พญาไท กรุงเทพฯ 10330

หน้าที่ 1 ของจำนวน 1 หน้า

วันที่รายงานผล 26 กุมภาพันธ์ 2553

----- เริ่ม รายงาน -----

รายงานการทดสอบ

หมายเลขรายงานที่ TM0055/10

ชื่อและที่อยู่ผู้ส่งตัวอย่างทดสอบ

ผศ.ดร. ชื่นจิต ประภคชัชวีพัฒนา MRG-WI 515S066 ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ส่งตัวอย่าง: ผู้ส่งตัวอย่างเป็นผู้ส่งตัวอย่าง

รายละเอียดตัวอย่างทดสอบ

ชื่อตัวอย่าง: กุ้งสด 648

รหัส/รุ่น(สินค้า): -

รหัสตัวอย่างที่: M0071/10

บรรจุภัณฑ์: ถุงพลาสติกทึบแสง

ลักษณะตัวอย่าง: กุ้งสด

วันที่รับตัวอย่าง: 24 กุมภาพันธ์ 2553

วันที่ทดสอบแล้วเสร็จ: 26 กุมภาพันธ์ 2553

ผลการทดสอบ

รายการที่ทดสอบ	ผล	วิธีทดสอบ
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	< 3 MPN/g.	FDA-BAM

หมายเหตุ : อ้างอิง Food and Drug Administration, 2001.

----- สิ้นสุด รายงาน -----

ลงชื่อ.....

(นางสาวรัชชิตา เดชอุดม)

ผู้จัดการวิชาการจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเชียร)

รองผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ กักผล)

ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

ผลการทดสอบนี้รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทดสอบเท่านั้น

ห้ามนำรายงานการทดสอบนี้ไปประกาศ

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ตารางที่ จ.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นต่างๆ

Dependent Variable	Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Cell population	Corrected Model	1.190 ^a	2	.595	185.089	.001
	Intercept	462.776	1	462.776	1.440E5	.000
	salt	1.190	2	.595	185.089	.001
	Error	.010	3	.003		
	Total	463.975	6			
	Corrected Total	1.199	5			

ตารางที่ จ.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณ AHL ซึ่งบ่งชี้ในค่า OD₅₂₀ ที่ตรวจวัดได้จาก *V. parahaemolyticus* เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นต่างๆ

Dependent Variable	Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Absorbance at 520 nm	Corrected Model	.010 ^a	2	.005	637.612	.000
	Intercept	.020	1	.020	2.401E3	.000
	salt	.010	2	.005	637.612	.000
	Error	2.450E-5	3	8.167E-6		
	Total	.030	6			
	Corrected Total	.010	5			

ตารางที่ ๑.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ

Dependent Variable	Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Cell population	Corrected Model	.233 ^a	4	.058	22.730	.002
	Intercept	789.965	1	789.965	3.086E5	.000
	Bacterial type	.233	4	.058	22.730	.002
	Error	.013	5	.003		
	Total	790.211	10			
	Corrected Total	.246	9			

ตารางที่ ๑.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณ AHL ซึ่งบ่งชี้ในค่า OD₅₂₀ ที่ตรวจวัดได้จาก *V. parahaemolyticus* เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ

Dependent Variable	Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Absorbance at 520 nm	Corrected Model	.001 ^a	4	.000	8.751	.018
	Intercept	.128	1	.128	7.420E3	.000
	Bacterial type	.001	4	.000	8.751	.018
	Error	8.650E-5	5	1.730E-5		
	Total	.129	10			
	Corrected Total	.001	9			

ตารางที่ ๑.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* เมื่อมีอิทธิพลของอุณหภูมิ

Dependent Variable	Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Cell population	Corrected Model	.080 ^a	2	.040	10.298	.045
	Intercept	498.305	1	498.305	1.283E5	.000
	temp	.080	2	.040	10.298	.045
	Error	.012	3	.004		
	Total	498.397	6			
	Corrected Total	.092	5			

ตารางที่ ๑.6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณ AHL ซึ่งบ่งชี้ในค่า OD₅₂₀ ที่ตรวจวัดได้จาก *V. parahaemolyticus* เมื่อมีอิทธิพลของอุณหภูมิ

Dependent Variable	Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Absorbance at 520 nm	Corrected Model	.001 ^a	2	.000	60.711	.004
	Intercept	.071	1	.071	1.126E4	.000
	temp	.001	2	.000	60.711	.004
	Error	1.900E-5	3	6.333E-6		
	Total	.072	6			
	Corrected Total	.001	5			

ตารางที่ ๑.7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของค่า OD₅₂₀ เมื่อมีอิทธิพลจากองค์ประกอบของอาหารทะเล

Dependent Variable	Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Absorbance at 520 nm	Corrected Model	.000 ^a	1	.000	27.657	.006
	Intercept	.276	1	.276	2.370E4	.000
	condition	.000	1	.000	27.657	.006
	Error	4.667E-5	4	1.167E-5		
	Total	.277	6			
	Corrected Total	.000	5			

ตารางที่ ๑.8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* เมื่อมีอิทธิพลจากองค์ประกอบของอาหารทะเล

Dependent Variable	Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Cell population	Corrected Model	2.500E-5 ^a	1	2.500E-5	.009	.935
	Intercept	335.439	1	335.439	1.147E5	.000
	condition	2.500E-5	1	2.500E-5	.009	.935
	Error	.006	2	.003		
	Total	335.445	4			
	Corrected Total	.006	3			

ตารางที่ ๑.๑ การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณ AHL ซึ่งบ่งชี้ในค่า OD₅₂₀ ที่ตรวจวัดได้จาก *V. parahaemolyticus* เมื่อมีอิทธิพลจากองค์ประกอบของอาหารทะเล

Dependent Variable	Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Absorbance at 520 nm	Corrected Model	.000 ^a	1	.000	27.557	.034
	Intercept	.055	1	.055	3.606E3	.000
	condition	.000	1	.000	27.557	.034
	Error	3.050E-5	2	1.525E-5		
	Total	.055	4			
	Corrected Total	.000	3			

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวกิติมา เชื้อพานิช เกิดเมื่อวันที่ 26 พฤศจิกายน พ.ศ. 2527 ที่จังหวัดระนอง สำเร็จ การศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เมื่อปีการศึกษา 2549 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตร มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2550

การนำเสนอผลงานทางวิชาการ

กิติมา เชื้อพานิช, ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา และ พัชณิตา ธรรมรงค์กิจ. 2552. ประเมิน วิธีการตรวจสอบ *Vibrio parahaemolyticus* เชิงปริมาณ โดยอาศัยสมบัติการ สร้างสัญญาณควอรัมเซนซิง ชนิดเอสซิลไฮโมซีรีนแลกโทน. ใน การประชุมวิชาการ ระดับชาติ ครั้งที่ 6 (ภาคบรรยาย). วันที่ 8-9 ธันวาคม 2552 ณ มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.